

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
Departamento de Estomatología III



**INFLUENCIAS DE LAS VARIACIONES
HORMONALES EN EL PERIODONTO.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Elena Figuro Ruiz

Bajo la dirección de los doctores

Antonio Bascones Martínez
Rocío Cerero Lapiedra

Madrid, 2010

- **ISBN: 978-84-693-1268-1**

TESIS DOCTORAL:
ELENA FIGUERO RUIZ

MADRID, 2009

Para Carmen, Juan, Diego y Jose

Mientras haya alguien que crea en una idea,

la idea vive.

Ortega y Gasset

Agradecimientos

Mi primer agradecimiento está dirigido a las tres personas sin cuya supervisión este trabajo no habría sido posible:

El **Prof. Antonio Bascones**, por haberme abierto las puertas del mundo de la investigación y haber confiado en mí para realizar esta tarea. Su apoyo incondicional ha sido fundamental para que este proyecto haya visto la luz.

La **Prof. Rocío Cerero**, que siempre ha estado dispuesta a guiarme y orientarme y que me ha motivado para continuar cuando creía que ya estaba todo perdido.

La **Dra. Mena Soory**, no sólo por haberme acogido en el laboratorio de investigación del Guy's Hospital, si no por haberme enseñado todo aquello que estaba a su alcance. Su esfuerzo y dedicación me permitieron desarrollar mi trabajo en un periodo de tiempo limitado. Thank you very much.

En segundo lugar no puedo olvidarme del **Dr. Antonio González**, jefe del Servicio de Obstetricia del Hospital Universitario La Paz (Madrid), por habernos permitido el acceso a los servicios que de él dependían. Junto a él, el **Dr. Miguel Ángel Gallardo y todo el equipo del servicio de Odontología del ambulatorio José Marvá** (Área V de Madrid), que amablemente nos prestaron sus instalaciones y su ayuda para poder realizar nuestro trabajo. Y por supuesto a los **Servicios de Recepción del Ambulatorio José Marvá y de la facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid** (UCM), sin los cuales la recolección de pacientes hubiera sido prácticamente imposible.

A continuación no puedo dejar de agradecer la ayuda que me han prestado desde el **laboratorio de investigación de la UCM**. A Itziar González y Ana O'Connor, porque sin ellas los kits de ELISA nunca habrían sido lo mismo. A Lola y a Conchita, porque nadie mejor que ellas para comprender lo perfeccionista que uno puede llegar a ser.

A **Pedro Cuesta y Santiago Cano**, del Servicio de Cálculo de la UCM, por participar activamente en la ardua tarea del análisis estadístico de los datos que aquí se presentan.

Para poder llevar a cabo una investigación, es fundamental tener unas bases de conocimientos previos. Gran parte de mi bagaje intelectual proviene de lo aprendido durante mi formación en el *master de Periodoncia de la UCM*. Por ello, quiero agradecer a profesores y compañeros el haber estimulado mi deseo por saber y aprender cada día más, con un interés especial hacia el Prof. Mariano Sanz y el Prof. David Herrera.

Durante mi etapa predoctoral he conocido a múltiples y variadas personas; entre ellas, quiero destacar a todo *el equipo de Medicina Oral* de la facultad de Odontología de la UCM, por haberme acogido en su seno durante mis primeros años de postgrado; a *Rubén León*, por haberme introducido en el maravilloso mundo de la biología molecular; a *María Sánchez y Arancha Llamas*, por conseguir hacerme entender que el laboratorio supone una nueva dimensión en la mente de cada uno; *a Ale, Mile, Andrea, Marie, Estefania* y todas aquellas personas con las que he compartido tantas horas; y entre ellas, no puedo por menos que citar a *Ana Carrillo*, porque, esto no habría sido lo mismo sin ella, ya que, “a pesar de todo”, al final hemos conseguido formar un buen equipo.

Por supuesto, que este trabajo no habría sido posible sin la participación de todas esas *mujeres, embarazadas o no*, que voluntariamente nos ofrecieron su tiempo y la oportunidad de avanzar en el conocimiento. Muchas gracias a todas ellas.

Gracias a los laboratorios **Dentaid** ®, (Sant Cugat del Vallés, Barcelona) y **Colgate** ® (Piscataway, NJ, Estados Unidos) que de forma desinteresada nos suministraron pastas y cepillos de dientes para todos los pacientes.

Por último, no puedo quedarme sin nombrar a *mi familia* que ha estado ahí, apoyándome, aguantándome, sufriendo junto a cada uno de mis baches, pero disfrutando de cada uno de mis logros. Son lo mejor que tengo y por ello, mi más cariñoso agradecimiento desde lo más profundo de mi corazón. Gracias **Carmen, Juan, Diego y Jose**.

Nota aclaratoria

El presente trabajo de investigación ha sido desarrollado gracias a la concesión de una *beca de investigación predoctoral del Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación y Ciencia* (AP2002-3116. Resolución 2002-12-31) renovada durante un total de cuatro años (31/12/2002 a 31/12/2006).

Durante este periodo se ha llevado a cabo un estudio clínico en el que se han evaluado los cambios gingivales asociados al embarazo desde un punto de vista clínico e inmunológico. La idea general parte de la búsqueda de una situación clínica real que permita analizar en un periodo de tiempo limitado el efecto de ciertas hormonas (progesterona y estradiol) en el periodonto (***“Cambios gingivales asociados al embarazo. Influencia de las variaciones hormonales en los parámetros clínicos e inmunológicos”***).

De forma adicional y como beneficio complementario al Programa de la Beca Predoctoral FPU se realizó una estancia de tres meses de duración en el Departamento de Periodoncia del *King's College London Dental Institute* (King's College Dental Hospital. Denmark Hill. London SE5 9RW. Reino Unido), durante el cual se desarrolló una línea de investigación basada en los resultados preliminares obtenidos en el estudio clínico.

Por ello, se empleó el potencial efecto beneficioso de un tipo de fitohormonas, los fitoestrógenos, por ser componentes similares a los estrógenos, pero sin presentar sus conocidos efectos adversos (caracteres sexuales secundarios). El resultado de esta idea es un estudio *in vitro* obtenido tras la aplicación de una metodología puesta a punto por el grupo de la Dra. Soory (Guy's Hospital), y que aparece desarrollada en la segunda parte del presente documento (***“Oxidant / antioxidant interactions of nicotine, coenzyme Q10, pycnogenol and phytoestrogens in oral periosteal fibroblasts and MG63 osteoblasts”***).

ESTRUCTURA GENERAL

1. PARTE I.....13

Cambios gingivales asociados al embarazo. Influencia de las variaciones hormonales en los parámetros clínicos e inmunológicos.

2. PARTE II.....255

Oxidant / antioxidant interactions of nicotine, coenzyme Q10, pycnogenol and phytoestrogens in oral periosteal fibroblasts and MG63 osteoblasts.

3. ARTÍCULOS ORIGINALES.....379



**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA III**

**CAMBIOS GINGIVALES ASOCIADOS AL
EMBARAZO.**

**INFLUENCIA DE LAS VARIACIONES
HORMONALES EN LOS PARÁMETROS
CLÍNICOS E INMUNOLÓGICOS**

**TESIS DOCTORAL:
ELENA FIGUERO RUIZ**

**DIRECTORES:
ANTONIO BASCONES MARTÍNEZ
ROCÍO CERERO LAPIEDRA**

MADRID, 2009

I. INTRODUCCIÓN.....	19
1. EMBARAZO.....	21
1.1. Recuerdo fisiológico del ciclo genital femenino.....	21
1.1.1. Fase de maduración folicular.....	22
1.1.2. Fase de cuerpo lúteo.....	23
1.1.3. Regulación neurohormonal del ciclo genital femenino.....	24
1.2. Recuerdo fisiológico del embarazo.....	26
1.2.1. Cambios maternos durante el embarazo.....	31
1.2.2. Inmunología materno-fetal.....	33
1.3. Hormonas sexuales femeninas.....	34
1.3.1. Característica generales.....	34
1.3.2. Estrógenos.....	35
1.3.3. Gestágenos o progestágenos.....	37
1.3.4. Utilidad de la saliva como medio diagnóstico de los niveles hormonales.....	38
 2. ENFERMEDADES GINGIVALES.....	 41
2.1. Concepto y clasificación.....	41
2.2. Criterios diagnósticos.....	44
2.3. Epidemiología.....	46
2.4. Etiología.....	48
2.5. Histopatología.....	51
2.6. Enfermedades gingivales e inflamación.....	55
2.6.1. Fases generales del proceso inflamatorio.....	55
2.6.2. Mediadores de la inflamación.....	58
2.6.3. Potencial diagnóstico del fluido crevicular gingival.....	60
2.6.4. IL-1 β y PGE2 en el fluido crevicular gingival.....	62
 3. EMBARAZO Y ENFERMEDADES GINGIVALES.....	 67
3.1. Introducción.....	67
3.2. Asociación epidemiológica.....	70
3.3. Papel de las hormonas sexuales en la patogenia de la gingivitis gravídica.....	76
3.3.1. Hormonas y cambios vasculares.....	79

3.3.2. Hormonas y cambios celulares.....	80
3.3.3. Hormonas y cambios microbiológicos.....	82
3.4. Papel del sistema inmune en la gingivitis gravídica.....	84
3.4.1. Estudios experimentales.....	85
3.4.2. Estudios clínicos.....	89

II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS y OBJETIVOS.....93

III. PACIENTES Y MÉTODO.....97

1. PACIENTES.....	99
1.1. Población.....	99
1.2. Selección de los sujetos.....	100
1.2.1. Mujeres embarazadas.....	100
1.2.2. Mujeres no embarazadas.....	100
1.3. Potencia del estudio.....	100
2. MÉTODO.....	101
2.1. Diseño del estudio.....	101
2.2. Consentimiento informado.....	102
2.3. Cuestionario.....	102
2.4. Recogida de parámetros clínicos.....	102
2.4.1. Índice de placa.....	102
2.4.2. Índice gingival.....	103
2.5. Toma de muestras.....	104
2.5.1. Recogida de saliva.....	104
2.5.2. Muestras de fluido crevicular gingival (FCG).....	105
2.6. Análisis de las muestras.....	107
2.6.1. Análisis de hormonas en saliva.....	107
2.6.1.1. Preparación de las muestras.....	107
2.6.1.2. Progesterona.....	107
2.6.1.3. 17β-Estradiol.....	111

2.6.2. Análisis de las muestras de FCG.....	112
2.6.2.1. Calibrado del Periotron 8000®.....	112
2.6.2.2. Elución de las muestras.....	113
2.6.2.3. Interleuquina-1 β	114
2.6.2.4. Prostaglandina E ₂	119
3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	123
3.1. Estadística descriptiva.....	123
3.2. Estadística analítica.....	125
IV. RESULTADOS.....	129
1. SEGUIMIENTO.....	131
1.1. Grupo embarazo.....	131
1.2. Grupo no embarazo.....	133
2. EVOLUCIÓN DEL EMBARAZO.....	134
2.1. Variables clínicas.....	134
2.1.1. Índice de placa.....	134
2.1.2. Índice gingival.....	138
2.1.3. Reactividad gingival frente a la placa.....	142
2.2. Niveles de hormonas en saliva.....	146
2.2.1. Progesterona.....	146
2.2.2. Estradiol.....	147
2.3. Variables bioquímicas en FCG.....	148
2.3.1. Interleuquina 1 β	148
2.3.2. Prostaglandina E ₂	151
2.4. Correlaciones entre las variables.....	154
3. COMPARACIÓN ENTRE LOS GRUPOS DE ESTUDIO.....	159
3.1. Homogeneidad de los grupos de estudio.....	159
3.2. Comparacion entre embarazo y no embarazo.....	163
3.2.1. Variables clínicas.....	163
3.2.2. Niveles de hormonas en saliva.....	175

3.2.4. Variables bioquímicas en FCG.....	177
3.3. Comparación post-parto con no embarazo.....	181
3.3.1. Variables clínicas.....	181
3.3.2. Niveles de hormonas en saliva.....	182
3.3.3. Variables bioquímicas en FCG.....	183
V. DISCUSIÓN.....	185
1. Metodología del estudio.....	190
2. Principales limitaciones del estudio.....	196
3. Parámetros clínicos.....	198
4. Parámetros hormonales.....	208
5. Parámetros inmunológicos.....	212
6. Líneas de investigación futuras.....	220
VI. CONCLUSIONES.....	223
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	227
VIII. ANEXOS.....	247
1. Modelo de consentimiento informado.....	249
2. Modelo de cuestionario.....	251
3. Leyenda de abreviaturas.....	253

Capítulo I.

INTRODUCCIÓN

1. Embarazo.
2. Enfermedades gingivales.
3. Embarazo y enfermedades gingivales.

1. EMBARAZO

1.1. Recuerdo fisiológico del ciclo genital femenino

(Cunningham et al. 2007, González-Merlo et al. 2006, Mealey et al. 2003, Usandizaga & de la Fuente 2005)

Se entiende por ciclo genital femenino a la serie de fenómenos anatomofisiológicos que, desde la pubertad hasta la menopausia, aparecen de forma periódica y regular en el organismo de la mujer, muy especialmente en su aparato genital. Este proceso se repite de forma regular durante toda la etapa de madurez sexual, estando regido por estructuras superiores en el hipotálamo y la hipófisis.

El fenómeno fundamental del ciclo es la ovulación, que tiene lugar en el ovario, y que tiene una función doble: liberar células germinales capaces de ser fecundadas y secretar hormonas que van a tener una amplia repercusión en todo el organismo.

La formación de los estrógenos en los ovarios comienza entre la octava y la décima semana de gestación del feto y las oogonias se transforman en oocitos primarios entre las semanas diez y once. Un número finito de estas células germinales se concentra en el ovario con un máximo de siete millones de oocitos entre el quinto y el sexto mes de gestación. Posteriormente, a través del proceso de atresia, las células germinales decrecen en número hasta alcanzar el millón de folículos primordiales conteniendo un único óvulo cada uno en el momento del nacimiento. La mayoría de estos folículos no alcanzan su desarrollo, llegando a la pubertad unos 400.000. Será en este momento cuando la maduración final de estas células comience.

El ciclo ovárico puede ser dividido en dos fases: fase de maduración folicular y fase de cuerpo lúteo.

1.1.1. Fase de maduración folicular.

El primer signo del inicio del desarrollo folicular es la transformación de las células planas que rodean al oocito en el folículo primordial primario en células cúbicas, que proliferarán para dar lugar a un estrato denominado membrana granulosa. Por fuera de esta membrana, las células del estroma ovárico inician un proceso de diferenciación aumentando su volumen y vascularización para formar la teca interna. Esta estructura se denomina **folículo primario o preantral**.

Entre las células de la granulosa comienzan a aparecer pequeñas vacuolas, que al confluir, pasan a formar una cavidad llena de líquido transparente denominada antro folicular o cavidad antral, pasando a ser **folículos secundarios o antrales**.

La mayoría de estos folículos van a sufrir un proceso degenerativo e involutivo, de tal manera que sólo uno de los folículos continúa su crecimiento para convertirse en el **folículo dominante**. Éste, agranda aun más su cavidad antral y va aproximándose a la superficie del ovario. Al final de su desarrollo alcanza un diámetro de 16 a 22 mm pasando a denominarse **folículo maduro, terciario, de De Graaf o folículo preovulatorio**.

Todo este proceso dura aproximadamente dos semanas. A partir de este momento, se inician una serie de cambios que conducen a la ovulación. Se produce un despegamiento y salida del oocito de su zona de anclaje al folículo mediante la rotura folicular en su zona más prominente (estigma). Esto permite al oocito continuar su meiosis dando lugar a la formación de dos células: el oocito II y el primer corpúsculo polar.

Tras la ovulación se produce el colapso de la cavidad folicular, que se arruga y repliega apareciendo abundantes focos de hemorragia desde los vasos de la teca, que dan lugar a la formación de un coágulo hemático central y a un tapón de fibrina.

1.1.2. Fase de cuerpo lúteo

Tiene una duración más o menos constante (14 ± 2 días) y se divide en cuatro fases:

- a) **Proliferación:** Las células de la granulosa y la teca sufren un proceso de diferenciación específica y se transforman en células luteínicas.
- b) **Vascularización:** Se produce una gran proliferación de vasos invadiendo los espacios entre las células luteínicas.
- c) **Florescencia:** Es la fase de máxima actividad endocrina del cuerpo lúteo, que aparece como una glándula de 17 a 20 mm de diámetro, de color amarillento. El cúlmén de su actividad se alcanza al octavo día de esta fase.
- d) **Regresión o involución:** Si no se ha producido el embarazo, el cuerpo lúteo inicia su involución hacia el décimo día de la ovulación. Se produce una intensa infiltración por leucocitos y macrófagos, lo que produce una brusca liberación de radicales de oxígeno que, junto a otras citoquinas y factores inhibidores del crecimiento, lleva a una rápida involución de la glándula. Posteriormente, todo lo que era cuerpo lúteo queda sustituido por tejido conectivo que permanece en el ovario como una cicatriz fibrosa llamada el *corpus albicans*.
- e) En el caso de que se haya producido un embarazo el cuerpo lúteo no involucionará. Al decimocuarto día aumenta su tamaño y su función permanece hasta bien entrado el tercer mes de gestación. En estas circunstancias se denomina **cuerpo lúteo verdadero o del embarazo**.

1.1.3. Regulación neurohormonal del ciclo genital femenino

El hipotálamo es el órgano central regulador del ritmo cíclico que cumple las funciones de “reloj biológico”. Por medio de la secreción del factor liberador de gonadotropina (GnRH) provoca la liberación de gonadotropinas que actúan sobre el ovario.

Las hormonas gonadotropas son dos: la FSH u hormona estimulante de los folículos y la LH u hormona luteinizante. La FSH ejerce su acción sobre las células de la granulosa en el ovario, al mismo tiempo que estimula el crecimiento de las células germinales. La LH actúa sobre las células intersticiales y estromales promoviendo la síntesis de esteroides. A su vez, tiene una actividad fundamental en el desencadenamiento de la ovulación.

Normalmente, el primer día de hemorragia menstrual se designa como día 1 del ciclo. En este momento la producción de estrógenos es baja y la producción de FSH es máxima. Como resultado de la acción de la FSH varios folículos inician su crecimiento, aumentando los niveles de estrógenos al cabo de 4 o 5 días. Durante la primera mitad del ciclo, la secreción de FSH disminuye, al tiempo que aumenta la producción de estrógenos. Esta fase estrogénica da lugar también a un aumento en la producción de LH y, al parecer, desencadena los mecanismos endocrinos que dan lugar a la ovulación del folículo maduro en el día 14. Después de la ovulación los niveles de estrógenos disminuyen ligeramente durante varios días. No es raro que en estos momentos aparezca una ligera hemorragia de uno o dos días de duración.

En la segunda fase del ciclo aumenta con rapidez la producción de progesterona, cuyo efecto puede detectarse fácilmente a través de los cambios que sufre el endometrio en las 48 horas siguientes a la ovulación. En este punto, la secreción de LH disminuye. Al llegar el día 20, el nivel de estrógenos es parecido al existente antes de la ovulación y la progesterona se encuentra en su fase de máxima producción. A menos que se produzca la fecundación del ovocito y que este se implante en el endometrio, se produce una disminución en la secreción de estrógenos y progesterona, lo que produce una serie de alteraciones en el endometrio, que darán lugar a su necrosis y desprendimiento.

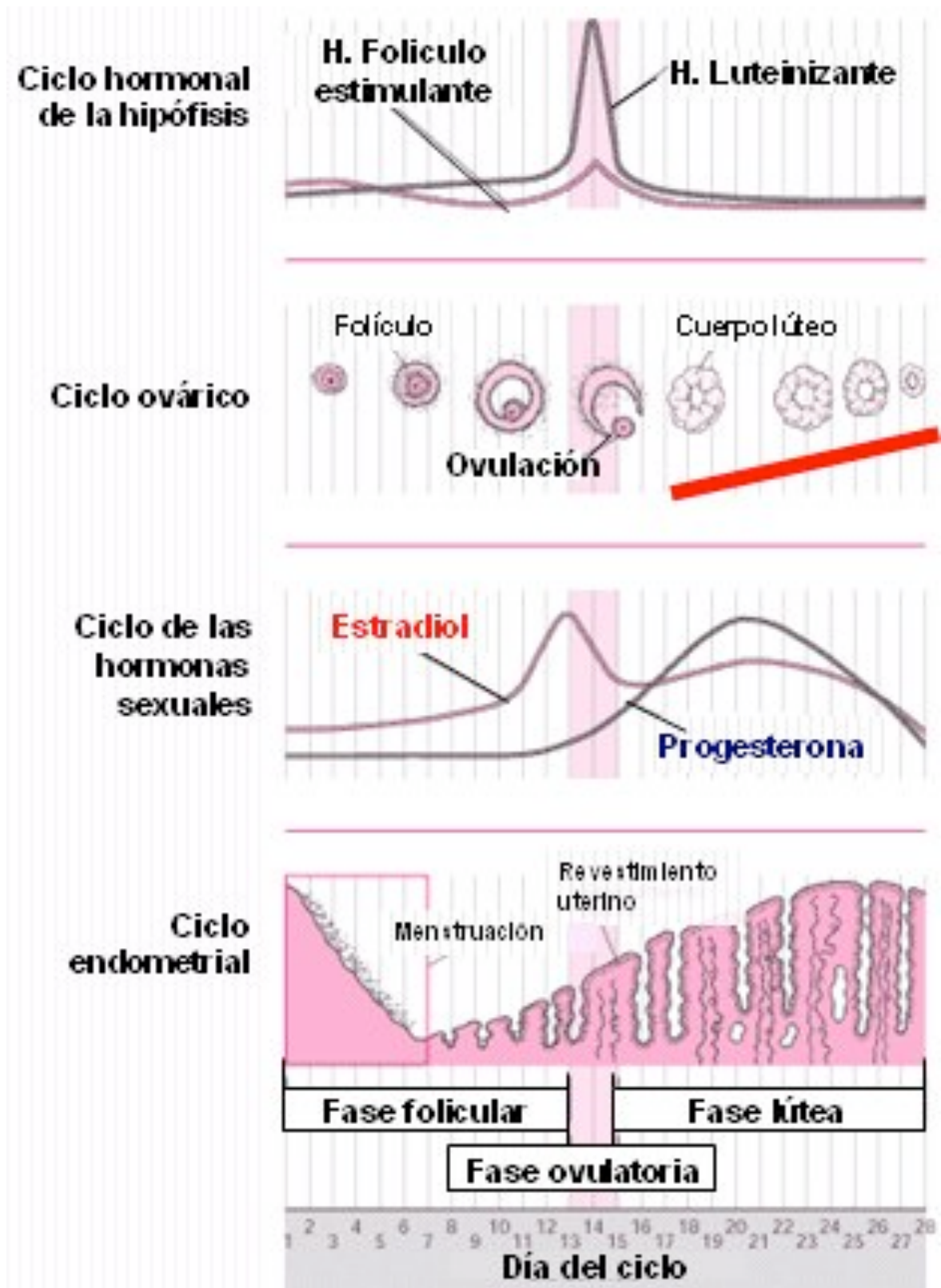


Figura 1: Representación gráfica de los cambios acontecidos durante el ciclo genital femenino

1.2. Recuerdo fisiológico del embarazo

(Cunningham et al. 2007, González-Merlo et al. 2006, Mealey et al. 2003, Usandizaga et al. 1997)

Se define el embarazo como la secuencia de eventos que ocurren normalmente durante la gestación de la mujer y generalmente incluyen la fecundación, el desarrollo embrionario, la implantación y el crecimiento fetal finalizando con el parto.

La **fecundación** es una secuencia de fenómenos coordinados que se inicia cuando entran en contacto dos gametos (oocito y espermatozoide). Sucede en el tercio distal de la Trompa de Falopio y requiere de un proceso de capacitación. Dura aproximadamente 24 horas y el tiempo medio durante el cual un espermatozoide posee la capacidad para fecundar un óvulo se estima entre 48 y 72 horas.

Para que la fecundación se lleve a cabo, el espermatozoide debe penetrar en el citoplasma del óvulo y activar su maduración. Finalmente deberán fusionarse de forma correcta ambos pronúcleos (masculino y femenino), lo que conlleva que el oocito maduro se transforme en cigoto.

Tras la fecundación se inicia el periodo de **desarrollo embrionario**. El cigoto, una célula diploide con 46 cromosomas, presenta segmentación y formación de blastómeras. Conforme las blastómeras siguen dividiéndose, se produce una esfera de células que simula una mora sólida y que recibe el nombre de mórula (16-32 células). La mórula se traslada a la cavidad uterina desde las Trompas de Falopio casi tres días después de la fecundación. Todas las blastómeras que forman el embrión se compactan y se produce la diferenciación celular. En este momento se dice que la mórula se ha transformado en blastocisto. Se forma una cavidad denominada blastocelo, rodeada de una monocapa de células epiteliales, denominada trofoectodermo y una masa celular interna. El trofoectodermo contribuye a la formación de las capas trofoblásticas de la placenta, mientras que la masa celular interna dará lugar al embrión y a las membranas extraembrionarias como el alantoides y el amnios (Fontana 2008).

La **implantación embrionaria** es el proceso por el cual el embrión en fase de blastocisto se fija al endometrio materno para continuar su desarrollo. Ocurre

generalmente en el tercio medio y superior de la pared posterior del útero y se produce en un periodo denominado ventana de implantación. Se extiende entre los días sexto a décimo después de la ovulación y debe coincidir con el desarrollo embrionario en fase de blastocisto. Está mediado por una población de células especializadas del blastocisto, denominada trofoblasto, que se forma por diferenciación del trofoectodermo.

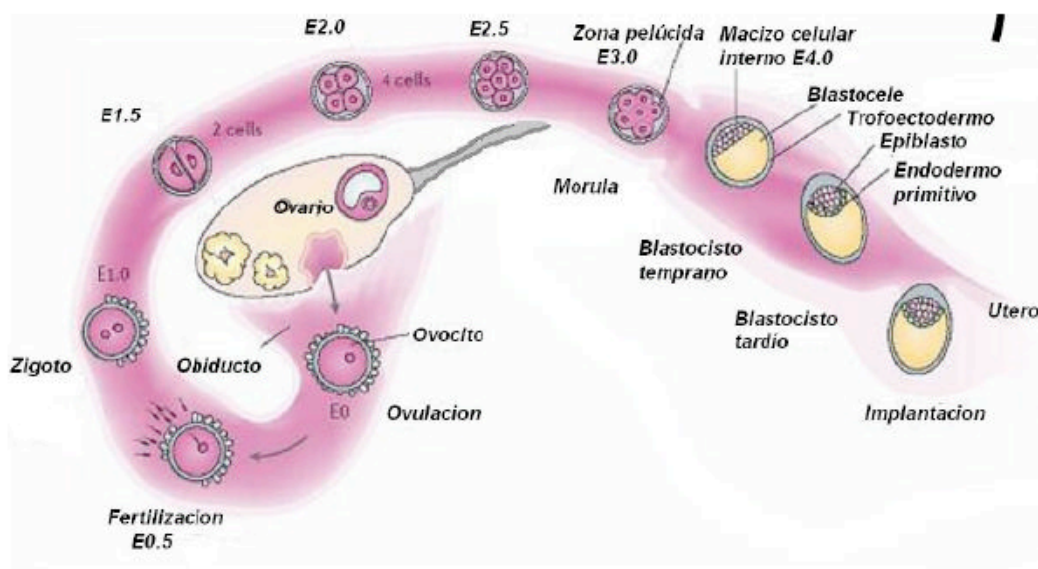


Figura 2: Desarrollo de un embrión pre-implantario e implantación

El periodo de implantación engloba cuatro fases diferenciadas:

- *Aposición:* el blastocisto humano “busca” su lugar de implantación, orientándose de forma específica con su masa celular interna en el polo en el que el trofoectodermo se va a adherir al epitelio endometrial superficial.
- *Adhesión:* se produce el contacto directo entre el epitelio endometrial y el trofoectodermo del blastocisto, con lo que el embrión queda “pegado” al útero. Estas dos fases ocurren entre el sexto y séptimo día después de la fertilización.
- *Rotura de la barrera epitelial:* fundamental para permitir la progresión del blastocisto hacia el estroma endometrial.
- *Invasión:* el trofoblasto embrionario penetra en el estroma e invade los vasos endometriales-miometriales, reemplazando en parte a las células endoteliales.

Se puede comprobar que la implantación es un proceso progresivo y versátil, que requiere de una preparación previa por parte del endometrio que va a recibir el embrión y del embrión que será recibido. Por ello, se debe establecer una “comunicación cruzada” entre los tejidos maternos y fetales, mediada a través de citoquinas, células *natural killer* (NK) y células T reguladoras (Fontana, 2008).

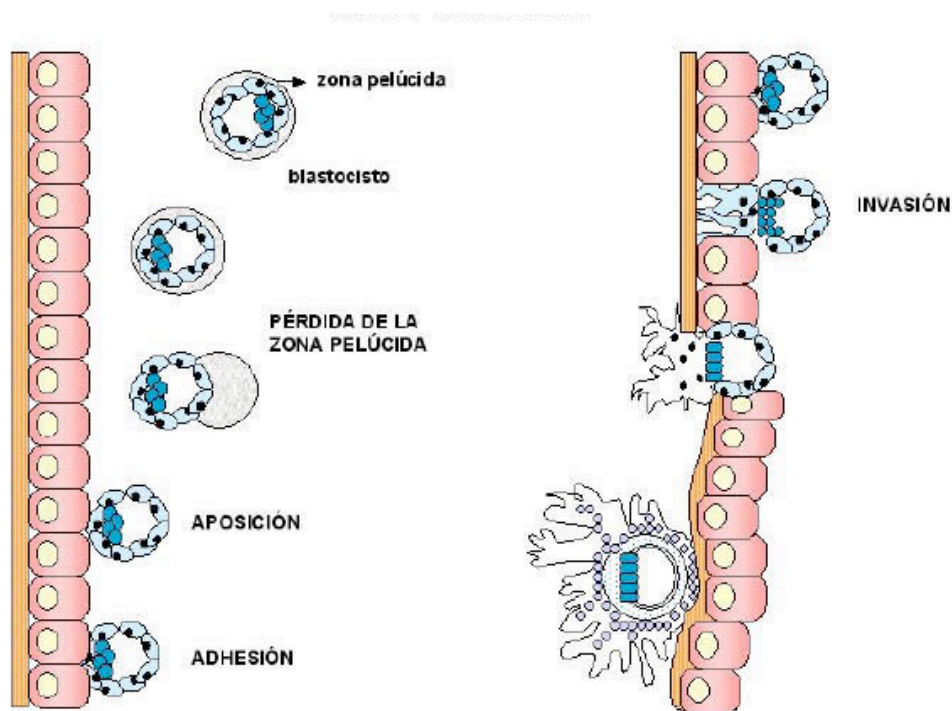


Figura 3: Fases de la implantación

A los 7,5 días de desarrollo el blastocisto ya ha realizado su implantación inicial en el endometrio y la masa celular interna conocida como disco embrionario se diferencia en el ectodermo primario y el endodermo. Algunas células aparecen entre el disco embrionario y el trofoblasto y cierran un espacio que se convertirá en la cavidad amniótica.

El mesénquima embrionario aparece por primera vez como un conjunto de células aisladas dentro de la cavidad del blastocisto. Cuando la cavidad está completamente recubierta por mesodermo se denomina vesícula coriónica y su membrana, ahora llamada corion, está constituida por células del trofoblasto y mesénquima. Las células mesenquimatosas dentro de la cavidad son las más numerosas y en un momento dado se

condensarán para formar el pedículo corporal, que sirve para unir el embrión al corion y luego se transforma en el cordón umbilical.

Al término de la cuarta semana el embrión mide de 4 a 5mm de longitud y la diferenciación del corazón primitivo ya ha comenzado. Tras la sexta semana, el embrión mide de 22 a 24 mm de longitud y el corazón ya se ha formado por completo.

La diferenciación entre el periodo embrionario y fetal se determina de forma arbitraria como presente a las ocho semanas tras la fecundación o a las 10 tras el último periodo menstrual. Para entonces, el embrión o feto ya tiene casi 4cm de longitud. La mayor parte del desarrollo pulmonar está aun por ocurrir, pero la mayor parte de las estructuras corporales importantes ya se han formado.

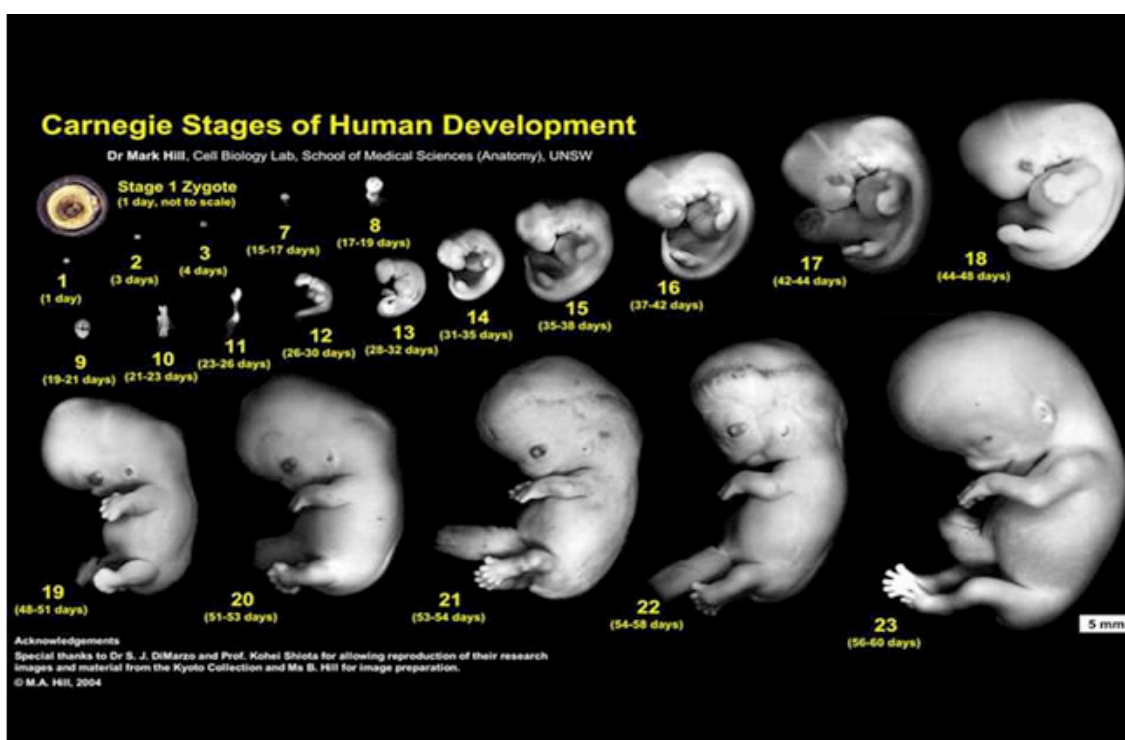


Figura 4: Etapas de Carnegies

El *periodo fetal* es el comprendido desde el comienzo del tercer mes hasta el final de la vida intrauterina y se caracteriza por un crecimiento rápido del cuerpo, siendo más lento el desarrollo de la cabeza. Durante este periodo aumenta considerablemente el tamaño y el volumen fetal. Hacia el final de la primera mitad de la vida intrauterina, el feto aumenta rápidamente de longitud, mientras que el peso fetal es de sólo 500g,

siendo en la segunda mitad de la vida intrauterina cuando el aumento de peso es más rápido. En la décima semana, la longitud máxima se duplica hasta los 60 mm.

Alrededor de los noventa días, el feto mide ya 90mm y pueden detectarse movimientos máxilares rítmicos y de deglución. Durante el segundo trimestre se alcanza la mitad de la longitud máxima del neonato. Tiene un aspecto arrugado por la falta de tejido conectivo subyacente y la madre puede percibir los movimientos fetales.

Durante el tercer trimestre, el contorno corporal se redondea gracias al depósito de grasa subcutánea y la piel deja de estar arrugada. Por lo general, los testículos entran en el escroto. Cerca del término, los movimientos oculares y fetales, la posición, los movimientos respiratorios y el pulso cardíaco se utilizan como marcadores de bienestar fetal.

Se han empleado varios términos para definir la duración del embarazo,

- ***La edad gestacional o menstrual***, que corresponde al tiempo transcurrido desde el primer día de la última menstruación, momento que, en realidad, precede a la concepción. Este término es el más empleado, puesto que casi todas las mujeres conocen la fecha de su último periodo menstrual. Sin embargo, hay que tener en cuenta que es una fecha que suele ser dos semanas anterior a la ovulación y a la fecundación.
- ***La edad ovulatoria***, o tiempo transcurrido a partir de la ovulación. En los últimos tiempos este término está siendo más empleado debido al uso creciente de los tratamientos para la infertilidad que permiten saber con exactitud el momento de la ovulación.

En promedio transcurren casi 280 días o 40 semanas entre el primer día del último periodo menstrual y el nacimiento del feto, lo que corresponde a 9,33 meses de calendario o 10 unidades de 28 días cada una. El periodo de gestación también puede dividirse en tres unidades de tres meses cada una (13 semanas) o tres trimestres, debido a que se pueden designar importantes puntos de referencia obstétricos de manera conveniente. Por ejemplo, la posibilidad de aborto espontáneo se limita principalmente al primer trimestre, en tanto que la supervivencia del lactante aumenta mucho en embarazos que alcanzan el tercer trimestre.

1.2.1. Cambios maternos durante el embarazo

El embarazo representa un estado especial en el que todos los órganos se ven alterados para facilitar el desarrollo del feto sin comprometer la salud materna. Es además una situación biológica particular por tratarse de un acontecimiento que ocurre durante un periodo limitado de tiempo.

Desde un punto de vista endocrino, el embarazo es una situación caracterizada por la elevación de los niveles circulantes de progesterona y estradiol. El cuerpo lúteo del embarazo secreta estrógenos y progesterona hasta el cuarto mes del embarazo en cantidades sólo ligeramente superiores a las que se producen después de la ovulación y en la segunda mitad del ciclo menstrual. Sin embargo, a partir del sexagésimo día de gestación, la placenta se convierte en el principal productor de estas hormonas, aunque nunca llega a ser un órgano endocrino autónomo, ya que los esteroides producidos por ella proceden de precursores de esteroides que ingresan a través de la sangre materna o fetal. Estos niveles hormonales elevados durante el embarazo, junto con alteraciones mecánicas y bioquímicas, se traducen en cambios a distintos niveles del organismo materno (Usandizaga et al. 2005):

a) Adaptación cardiovascular

Las alteraciones en el sistema cardiovascular durante el embarazo se consideran el ejemplo más palpable de los cambios producidos por la gestación en los órganos maternos.

El volumen sanguíneo total y el volumen plasmático crecen linealmente durante la gestación y alcanzan alrededor de la semana 28-32 valores un 40% superiores a los previos a la gestación, lo que implica una ganancia total de líquidos de aproximadamente 6000-8000 ml. A pesar del sustancial aumento de la volemia, la gestante no se hace hipertensa, debido a que disminuye la resistencia vascular periférica durante las fases de mayor incremento de la volemia.

Por otro lado, la hipervolemia origina un aumento del gasto cardíaco y una disminución del hematocrito (15-20%) durante los dos primeros trimestres del embarazo, conocida como anemia fisiológica del embarazo.

b) Adaptación pulmonar

Los cambios pulmonares durante la gestación evolucionan de forma compleja. El volumen respiratorio circulante aumenta gradualmente (35-50%) y la capacidad pulmonar total se reduce (4-5%) por la elevación del diafragma, aunque se compensa con el aumento de las dimensiones torácicas. La capacidad residual funcional, el volumen residual y el volumen de reserva respiratorio decrecen un 20%. Estos hechos condicionan un aumento de la ventilación alveolar (65%) durante el embarazo. Además, la capacidad inspiratoria aumenta (5-10%), alcanzando el máximo a las 22-24 semanas.

c) Adaptación del aparato digestivo

El efecto predominante de la gestación sobre los órganos gastrointestinales está vinculado a los efectos de la progesterona sobre la actividad del músculo liso. El reflujo esofágico y la pirosis, que son las molestias más frecuentes, se deben tanto a la relajación mediada por las hormonas como a la compresión del útero en sentido craneal.

d) Adaptación del aparato urinario

Los cambios en el aparato urinario están mediados por la acción de las hormonas placentarias y por los ajustes cardiovasculares que acontecen y se caracterizan por un incremento del flujo sanguíneo renal y la tasa de filtración glomerular (40%). A pesar de ello, no se produce un incremento de la diuresis, aunque la disminución en la eficacia del esfínter uretral, junto con la compresión uterina, pueden provocar cierta incontinencia urinaria según aumenta la gestación.

e) Otros cambios:

Aparecen cambios músculo-esqueléticos (lordosis progresiva), metabólicos (incremento del peso, de las necesidades calóricas, alteración del metabolismo hídrico, proteico, lipídico, hidrocarbonado), hematológicos (incremento en la eritropoyesis, ligeras elevaciones de los leucocitos, acortamiento de la supervivencia de las plaquetas, disminución de la actividad fibrinolítica), en los tegumentos (incremento en la actividad melanocítica, estímulo del crecimiento de los folículos pilosos y aparición de estrías) y por supuesto en el aparato genital.

1.2.2. Inmunología materno-fetal

Uno de los principales interrogantes de la reproducción es por qué, siendo el embrión genética e inmunológicamente diferente de la madre, no es rechazado por ésta, especialmente cuando se ha comprobado que durante el embarazo tanto la inmunidad humoral como la celular de la gestante son normales. Además, se ha demostrado que el embrión de un animal transplantado al útero de otro animal de distinta especie es rechazado. Por lo tanto, no es cierto, como se había afirmado anteriormente, que el útero sea un espacio inmunológicamente privilegiado (González-Merlo et al. 2006).

Actualmente se acepta que una de las acciones biológicas más importantes del trofoblasto es evitar el rechazo del embrión y del feto por la madre. Los mecanismos de tolerancia inmunológica asociados a la interfase materno-fetal son diversos, entre ellos se encuentra:

a) La expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) no clásicas, Clase I, HLA-G, por parte de las células del trofoblasto. La ausencia de antígenos del CMH clásicos impide la presentación antigénica a los linfocitos T y las respuestas inmunes celulares citotóxicas. Por otro lado, el HLA-G presenta péptidos que activan específicamente receptores inhibidores de las células *natural killer* (Iglesias et al. 2002, Gutiérrez et al. 2006).

b) La secreción local de factores solubles, incluyendo hormonas y citoquinas con un perfil Th2, con expresión de interleuquinas 4 (IL-4), IL-6, IL-10 y factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), fenotípicamente inmunosupresor. Por otro lado, el trofoblasto fetal expresa receptores de baja afinidad para las citoquinas relacionadas con un perfil Th1 (IL-2, factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interferón γ) (Gutiérrez et al. 2006).

Estas desviaciones inmunológicas, al no ser sólo locales, pueden tener implicaciones sistémicas en la madre, haciéndolas más susceptibles a procesos infecciosos, autoinmunes o alérgicos, sobre todo si existen factores predisponentes previos (Iglesias et al. 2002, Gutiérrez et al. 2006).

1.3. HORMONAS SEXUALES FEMENINAS

1.3.1. Características generales.

Se denominan hormonas sexuales a las producidas por el ovario (o el testículo) y cuyas acciones se manifiestan en el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios y en el proceso de la reproducción. Pertenecen a una subclase de lípidos denominados genéricamente esteroides, que se caracterizan por tener una estructura básica común: el ciclopentanoperhidrofenantreno, que está formado por tres anillos bencénicos (A, B, C), constituidos cada uno por seis átomos de carbono y un anillo ciclopentano (D), formado por cinco átomos de carbono.

Existen tres grandes grupos de esteroides sexuales, que se diferencian entre sí por poseer cada uno un número específico de átomos de carbono:

- Con 18 átomos de carbono: el estrano, del cual derivan los estrógenos.
- Con 19 átomos de carbono: el androstano, del que derivan los andrógenos.
- Con 21 átomos de carbono: el pregnano. Derivan de él los gestágenos.

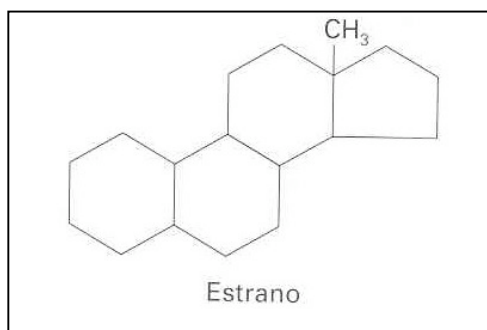


Figura 6: Representación gráfica del estrano

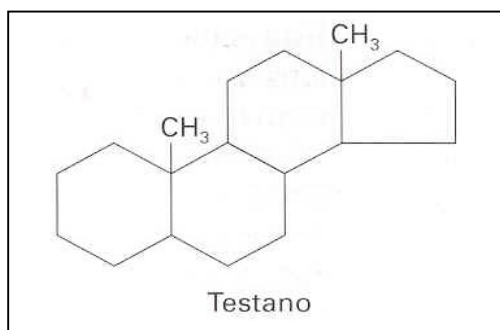


Figura 5: Representación gráfica del testano

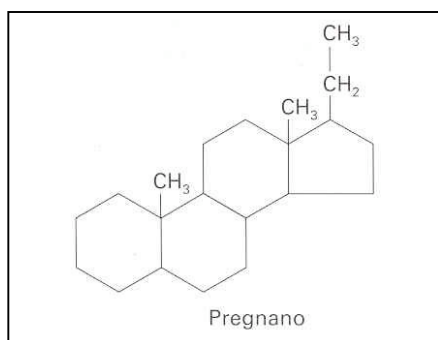


Figura 7: Representación gráfica del pregnano

1.3.2. Estrógenos

La denominación dada a estas hormonas procede de su capacidad para provocar el estro o período de celo en las hembras de los mamíferos. Además de los 18 átomos de carbono, poseen un anillo aromático (tres dobles enlaces) en el anillo A y un grupo hidroxilo en C-3.

Los estrógenos más importantes fisiológicamente producidos en el ovario son el estradiol y la estrona. Existe un tercer estrógeno natural, el **estriol**, de muy baja potencia como estrógeno, pero de elevada producción en caso de embarazo.

El **estradiol** es el estrógeno que secreta el ovario en mayor cantidad y el de mayor potencia biológica. La producción diaria de estradiol varía según la fase del ciclo ovárico, con cifras de 30 a 50 µg/día (70-100pg/ml) en la fase folicular precoz, 300 a 500 µg/día (220-400pg/ml) en la fase preovulatoria y 200 a 350 µg/día (150-250pg/ml) en la fase lútea. Tan ínfimas cantidades dan idea de su extremada potencia biológica, sobre todo al considerar que sólo una pequeña cantidad circula libre en sangre.

En la biosíntesis de los estrógenos durante el embarazo intervienen la madre, el feto y la placenta. La madre y el feto actúan como fuentes de precursores y la placenta es el órgano responsable de convertirlos en estrógenos. Los niveles de estrógenos maternos a lo largo del embarazo alcanzarán unas concentraciones treinta veces superiores a las que se encuentran en la fase lútea.

La **estrona** es el principal estrógeno posmenopáusico, es menos potente que el estradiol y no presenta cambios cíclicos.

Los estrógenos son los responsables de la aparición y mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios durante la etapa puberal, del crecimiento uterino y de la liberación de la hormona luteinizante desde el sistema nervioso central (Soory 2000a, b) Además, a corto plazo, son responsables directos de todas las transformaciones cíclicas que tienen lugar durante la fase folicular, en especial al grosor del endometrio y al moco cervical. También desarrollan su acción sobre el hipotálamo, la hipófisis, tiroides y glándula suprarrenal. Son importantes en el mantenimiento del sistema simpático y

parasimpático, intervienen en el equilibrio hidrosalino (retención de sodio y agua), en el metabolismo del calcio y del fósforo (limitando la reabsorción ósea), en el metabolismo hidrocarbonado y lipídico, actúan sobre la circulación y coagulación sanguínea y mantienen el turgor de la piel femenina.

Los estrógenos estimulan el metabolismo del colágeno y la angiogénesis. El estradiol-17 β incrementa la incorporación de prolina a la molécula de colágeno mientras está siendo sintetizada.

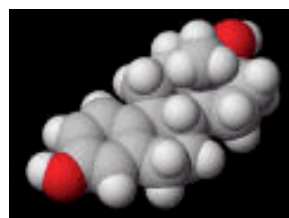
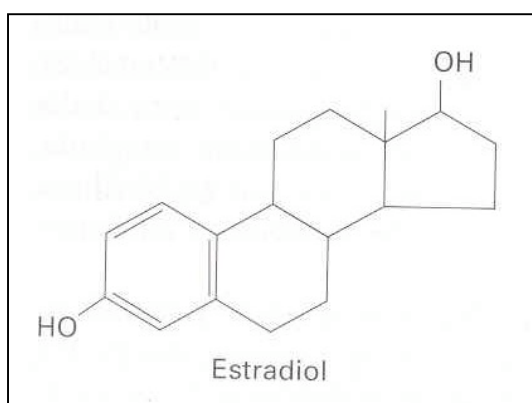


Figura 8: Representación química del estradiol.

1.3.3. Gestágenos o progestágenos

Los principales gestágenos producidos en el ovario son la pregnenolona y la progesterona. La **pregnenolona** es un precursor de todos los esteroides producidos en el ovario.

La **progesterona** es producida en grandes cantidades por el cuerpo lúteo (25 mg/día; 8-30 ng/ml), la corteza adrenal y la placenta. Es transportada por el plasma unida a albúmina y globulina. Posee una actividad biológica pequeña, lo que, unido a que tiene una vida media muy corta, justifica la presencia de tan grandes cantidades de esta hormona para ejercer su efecto. Su misión fundamental es la protección del embarazo en sus fases iniciales. Tiene también una acción termogénica importante, al producir una elevación de la temperatura en medio grado en la fase lútea del ciclo; una acción metabólica (retención de agua y sodio) y actuar sobre el crecimiento y el trofismo de la mama en colaboración con los estrógenos (Soory 2000a, b)

Durante el embarazo, el 90% de la progesterona producida en la placenta pasa a la circulación materna y el 10% restante a la circulación fetal. Los niveles de progesterona a lo largo del embarazo aumentan progresivamente, alcanzando unas concentraciones diez veces superiores que las que se encuentran durante la fase lútea del ciclo genital. La concentración en la semana 27 de la gestación es de 25 mg/ml.

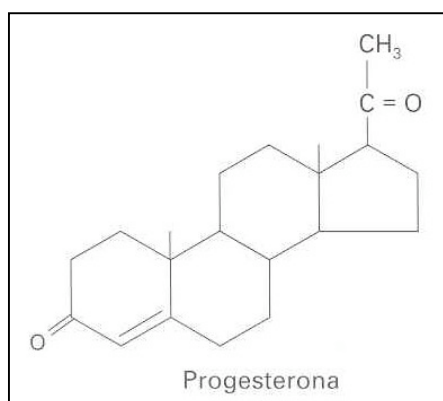


Figura 9: Representación química de la progesterona.

1.3.4. Utilidad de la saliva como medio diagnóstico de los niveles hormonales

La saliva es una mezcla de fluidos orales entre los que se incluyen tanto las secreciones de las glándulas salivales mayores y menores, como otros componentes de origen no salivar: fluido crevicular gingival (FCG), secreciones nasales y bronquiales, suero y sangre derivados de lesiones intraorales y bacterias y sus productos, virus, hongos, células epiteliales descamadas, otros componentes celulares y restos de comida (Kaufman & Lamster 2002).

Los dos métodos principales para recoger la saliva son (Navazesh 1993):

- El método de drenaje, en el cual la saliva gotea desde el labio inferior.
- El método de esputo, en el cual el sujeto escupe en el tubo de recolección.

Desde que se demostrara en el año 1964 que las hormonas esteroideas están presentes en la saliva y se pueden cuantificar (Katz & Shannon 1964), las ventajas de emplear este tipo de muestra han sido descritas en variadas ocasiones (Hofman 2001, Kaufman & Lamster 2002, Streckfus & Bigler 2002). Entre ellas se destaca que:

1. Es un método no invasivo, que permite la toma de muestras múltiples y su obtención en sujetos en los que por razones culturales, por edad o discapacidad no permiten la toma de muestras de sangre (Hofman 2001, Kaufman & Lamster 2002, Streckfus & Bigler 2002).
2. La concentración de hormonas presentes en saliva refleja la concentración de hormona libre en plasma, la cual se piensa que es el componente activo en sangre. Por tanto, los niveles de hormonas en saliva son una medición precisa de la cantidad de hormona activa en el cuerpo (Chatterton et al. 2005, Hofman 2001, Kaufman & Lamster 2002, Lequin et al. 1986, Meulenberg & Hofman 1989, Streckfus & Bigler 2002).
3. Puede recogerse en diversos dispositivos que permanecen estables a temperatura ambiente durante un tiempo (Chatterton et al. 2005, Hofman 2001).

4. Debido a la baja concentración de antígenos en saliva, el riesgo de contaminación cruzada es inferior al de la sangre (Hofman 2001).

Sin embargo, es también importante considerar que la saliva como método diagnóstico de los niveles hormonales presenta también ciertas limitaciones:

1. Debido a que las muestras no son estériles, están sujetas a degradación bacteriana a lo largo del tiempo (Hofman 2001).
2. La interpretación de los resultados es complicada, debido a que, aunque los patrones generales de variación diurnos y mensuales son paralelos a los del plasma, los rangos absolutos muestran variación entre los diferentes estudios (Hofman 2001).
3. Debido a que la concentración de hormonas en sangre es superior a la de saliva, se sugiere un problema debido a la contaminación de la muestra de saliva por el sangrado gingival (Hofman 2001).

A pesar de todo ello, la valoración de la relación riesgo/beneficio que presenta la saliva como medio para determinar la concentración de hormonas frente a la clásica determinación en sangre, permite considerarla como el medio diagnóstico ideal para determinar los niveles hormonales a lo largo de un amplio periodo de tiempo.

Niveles de hormonas en saliva durante el ciclo menstrual

A lo largo del ciclo menstrual las curvas que siguen las concentraciones de progesterona y estradiol se corresponden con los perfiles habituales encontrados en sangre, pero con menores valores y con picos de concentración de menor amplitud. (Gann et al. 2001)

En el caso del estradiol, se observa una alta variación diaria, lo que determina la aparición de perfiles que poseen un pico pre-ovulatorio claro, pero sin ningún otro rasgo típico de los niveles en suero (Gann et al. 2001). Puede detectarse en saliva en concentraciones que representan sólo el 1-2% de las del suero, que por tanto son similares a las concentraciones en suero de estradiol libre, que es el que tiene capacidad

de difusión en la saliva. Se ha encontrado una correlación estadísticamente significativa entre los niveles de estradiol en saliva y los niveles de estradiol libre en suero ($r=0,78$) (Wang et al. 1986).

La progesterona, en cambio, posee una clara elevación al inicio de la fase lútea, seguida por un pico claro en esta misma fase (Gann et al. 2001). Los niveles de progesterona en saliva muestran una buena correlación con los niveles en suero durante el ciclo menstrual ($r=0,9$) (Walker et al. 1979) y por tanto pueden emplearse para evaluar la función ovárica (Lipson & Ellison 1996, Walker et al. 1979).

Si se comparan las concentraciones de progesterona y estradiol en saliva en ciclos que conducen al embarazo y ciclos que no, se observa que los perfiles diarios de progesterona no muestran diferencias hasta el día cinco, momento a partir del cual las concentraciones de progesterona se elevan en respuesta a la liberación de gonadotropina humana coriónica. En cambio, las concentraciones de estradiol varían de forma estadísticamente significativa, siendo superiores en los ciclos que conducen a embarazo ($16,8 \pm 2,3 \text{ pmol/l}$ frente a $9,9 \pm 0,9 \text{ pmol/l}$ en la mitad de la fase folicular) (Lipson & Ellison 1996).

Niveles de hormonas en saliva durante el embarazo

Durante el embarazo, los niveles de progesterona y estradiol en saliva reflejan los niveles de progesterona ($r=0,88$) (Meulenberg & Hofman 1989) y estradiol ($r=0,98$) (Kundu et al. 1983) libres en plasma; incluso se ha propuesto emplear los niveles de estradiol en saliva como método para evaluar la función de la unidad feto-placentaria (Kaufman & Lamster 2002) y el incremento en la proporción de estriol-progesterona en saliva como predictor de parto prematuro (Darne et al. 1987, Kaufman & Lamster 2002).

Por otro lado, parece que la tasa de secreción de saliva no estimulada no se ve afectada durante el embarazo (Grau et al. 2002). No ocurre lo mismo con la tasa de saliva total estimulada que es menor durante los primeros meses del embarazo, tendiendo a normalizarse la situación hacia el final del embarazo (Grau et al. 2002, López-Jornet & Bermejo-Fenoll 1996).

2. ENFERMEDADES GINGIVALES

2.1. Concepto y clasificación.

Las **enfermedades periodontales** se definen como el conjunto de enfermedades que afectan a los tejidos de soporte del diente (cemento, ligamento periodontal, hueso alveolar y encía). Históricamente se ha realizado una distinción fundamental entre gingivitis y periodontitis. De esta forma, la **gingivitis** se define por la presencia de inflamación en la región marginal de la encía, sin afectar a otras estructuras del periodonto (Page 1986); mientras que la **periodontitis** se define como una enfermedad infecciosa que resulta en la inflamación de los tejidos de soporte del diente y pérdida progresiva de inserción y de hueso alveolar (Flemmig 1999).

Sin embargo, no todas las patologías que afectan a la encía pueden denominarse gingivitis, ya que en algunas de ellas la inflamación gingival no es el rasgo fundamental. Por ello, en 1999 se introdujo el término “**enfermedades gingivales**”. Se emplea para caracterizar al conjunto de signos y síntomas que afectan a la encía y que engloba a varias entidades patológicas (Mariotti 1999).

La clasificación de enfermedades gingivales que se utiliza en la actualidad es la introducida en el año 1999 por la Academia Americana de Periodoncia en el *International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions*. En ese encuentro las enfermedades gingivales fueron clasificadas en dos grandes grupos: inducidas por placa o no inducidas por placa (Armitage 1999) (Tabla 1).

Las **enfermedades gingivales inducidas por placa** se definen como aquellas entidades patológicas iniciadas por la placa dental y restringidas a los tejidos gingivales. Se describen cuatro grandes subgrupos: la gingivitis asociada sólo a placa dental y las enfermedades gingivales modificadas por factores sistémicos, por medicamentos o por malnutrición (Tabla 1).

Las **lesiones gingivales no inducidas por placa** conforman un grupo heterogéneo de entidades caracterizadas por no estar causadas por la acumulación de placa y por no desaparecer tras la retirada de la misma, aunque la severidad de sus manifestaciones clínicas suele depender de la interacción con la cantidad de placa presente. El término

gingivitis no puede emplearse para definir las, ya que en estos casos la inflamación es secundaria a la lesión. Dentro de este grupo se encuentran las enfermedades gingivales de origen bacteriano, viral, fúngico y genético, las manifestaciones gingivales de condiciones sistémicas, las lesiones traumáticas, las reacciones a cuerpo extraño y otras lesiones no especificadas (Holmstrup 1999) (Tabla 1).

Como se puede observar, el concepto de enfermedades gingivales engloba a un grupo heterogéneo de patologías. Nuestro proyecto se engloba dentro de las enfermedades gingivales inducidas por placa, por lo que a partir de este momento vamos a referirnos a ellas de forma exclusiva.

A. Enfermedades gingivales inducidas por placa*	
1. Gingivitis asociada sólo a placa dental	<ul style="list-style-type: none"> a. Sin otros factores locales asociados. b. Asociada a otros factores.
2. Enfermedades gingivales modificadas por factores sistémicos	<ul style="list-style-type: none"> a. Asociadas con el sistema endocrino: <ul style="list-style-type: none"> a.1. Gingivitis asociada a la pubertad. a.2. Gingivitis asociada al ciclo menstrual. a.3. Asociada al embarazo: <ul style="list-style-type: none"> a.3.1. Gingivitis. a.3.2. Granuloma piogénico. a.4. Gingivitis asociada a diabetes mellitus. b. Asociadas con discrasias sanguíneas: <ul style="list-style-type: none"> b.1. Gingivitis asociada a leucemia. b.2. Otras.
3. Enfermedades gingivales modificadas por medicamentos.	<ul style="list-style-type: none"> a. Agrandamientos gingivales. b. Gingivitis asociada a medicamentos: <ul style="list-style-type: none"> b.1. Asociadas a anticonceptivos orales. b.2. Otras.
4. Enfermedades gingivales modificadas por malnutrición	<ul style="list-style-type: none"> a. Déficit de ácido ascórbico. b. Otras

Tabla 1: Clasificación de las enfermedades gingivales inducidas por placa. *International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions*, 1999.

* Puede afectar a un periodonto sin pérdida de inserción o a un periodonto reducido.

B. Lesiones gingivales no inducidas por placa	
1. De origen bacteriano específico	<ul style="list-style-type: none"> a. Lesiones asociadas a <i>Neisseria gonorrhoeae</i>. b. Lesiones asociadas a <i>Treponema pallidum</i>. c. Lesiones asociadas a especies de Streptococos. d. Otras.
2. De origen viral	<ul style="list-style-type: none"> a. Infecciones por herpes virus: <ul style="list-style-type: none"> a.1. Gingivostomatitis herpética primaria. a.2. Herpes oral recidivante. a.3. Infecciones por varicela zoster. b. Otras.
3. De origen fúngico	<ul style="list-style-type: none"> a. Infecciones por <i>Candida</i>: <ul style="list-style-type: none"> a.1. Candidosis gingival generalizada. b. Eritema gingival lineal. c. Histoplasmosis. d. Otras
4. De origen genético	<ul style="list-style-type: none"> a. Fibromatosis gingival hereditaria. b. Otras
5. Manifestaciones gingivales de condiciones sistémicas	<ul style="list-style-type: none"> a. Desórdenes mucocutáneos: <ul style="list-style-type: none"> Liquen plano, penfigoide, pénfigo vulgar, eritema multiforme, lupus eritematoso, inducidos por medicamentos, otros. b. Reacciones alérgicas: <ul style="list-style-type: none"> b.1. Materiales dentales: mercurio, níquel, acrílico, otros. b.2. Atribuibles a : pastas dentífricas, colutorios, aditivos de chicles, aditivos y comidas. b.3. Otros.
6. Lesiones traumáticas	<ul style="list-style-type: none"> a. Lesión química b. Lesión física. c. Lesión térmica.
7. Reacciones a cuerpo extraño.	
8. No especificadas	

Tabla 2: Clasificación de las lesiones gingivales no inducidas por placa.
International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions, 1999.

2.2. Criterios diagnósticos

El diagnóstico de las enfermedades gingivales inducidas por placa engloba el estudio de los síntomas del paciente, de su historia médica y dental y la realización de una exploración clínica que incluye la descripción física de las lesiones, de su extensión, su distribución y su duración (Mariotti 1999).

Las características comunes a todas las enfermedades gingivales inducidas por placa incluyen la presencia de signos clínicos de inflamación, signos y síntomas confinados a la encía, reversibilidad de la patología al eliminar el factor etiológico, la presencia de depósitos de placa para iniciar o exacerbar la severidad de la lesión y un potencial papel como precursor de la pérdida de inserción alrededor de los dientes (Mariotti 1999).

La inflamación gingival o gingivitis se caracteriza por la presencia de contornos gingivales agrandados debido al edema o a la fibrosis, un cambio en la coloración gingival hacia un color rojo o amoratado, una elevación en la temperatura sulcular y un incremento en el exudado gingival. Para definir la existencia de enfermedad gingival, los signos clínicos de inflamación deben estar asociados con un nivel de inserción estable en un periodonto sin pérdida de inserción o en un periodonto sano reducido (Mariotti 1999).

Clínicamente se registra mediante el sondaje con una sonda periodontal, siguiendo los criterios del índice gingival de Loe descritos en 1963. Según este índice, un valor 0 indica ausencia de signos visuales de inflamación, 1 indica un ligero cambio en el color y en la textura de la encía, 2 indica que existe inflamación visual y tendencia al sangrado tras sondaje y 3 indica una inflamación exagerada con tendencia al sangrado espontáneo. También son muy empleados los índices dictómicos que determinan la presencia o ausencia de sangrado 15 segundos después del sondaje (Beck & Loe 1993).

Es fundamental realizar un diagnóstico diferencial correcto entre gingivitis y periodontitis, siendo ésta una patología irreversible que afecta a todas las estructuras de soporte del diente: ligamento periodontal, hueso alveolar, cemento radicular y encía. Se caracteriza por pérdida de inserción clínica, pérdida de hueso alveolar, formación de

bolsas periodontales e inflamación gingival (Flemmig 1999). A pesar de que la gingivitis va en paralelo con el nivel de higiene oral de la población y que parece que prácticamente siempre precede al desarrollo de la periodontitis, hay que tener en cuenta que, por si misma es una mala predictora de la actividad de enfermedad periodontal posterior (Albandar 2002, Haffajee et al. 1983, Hugoson & Norderyd 2008).

Parámetro	Encía sana	Gingivitis
Color	Rosa coral (relacionado con la pigmentación mucocutánea).	Coloración roja o amoratada.
Contorno	Festoneado gingival entorno a los dientes. La papila rellena los espacios interdentes y la encía marginal presenta una terminación en filo de cuchillo.	Desaparece la terminación en filo de cuchillo y el festoneado gingival debido al edema, que convierte las papilas en bullosas.
Consistencia	Tejido firme y resiliente.	Tejido friable y edematoso.
Sangrado al sondaje	Ausencia.	Presencia.
Exudado gingival	Mínimo.	Significativamente aumentado.
Temperatura	34°C	Ligeramente aumentado.

Tabla 3: Criterios diagnósticos de las enfermedades gingivales



Figura 10: Encía clínicamente sana.



Figura 11: Encía con gingivitis.

2.3. Epidemiología

Se ha determinado que la gingivitis inducida por placa es la enfermedad más prevalente del periodonto (Oliver et al. 1998). Sin embargo, para poder obtener datos epidemiológicos fiables sobre su prevalencia, es necesario establecer qué criterios clínicos usar en los estudios epidemiológicos. Muchos de ellos han empleado el índice periodontal de necesidades terapéuticas comunitarias (CPITN), el cual es adecuado para determinar las necesidades de tratamiento, pero no para determinar los cambios en la prevalencia de las enfermedades periodontales (Hugoson & Norderyd 2008). Aun no existe un acuerdo en la literatura científica sobre este término y cada autor establece su propio criterio, lo que explica la variabilidad de resultados obtenidos entre los autores (Hugoson & Norderyd 2008).

Los estudios epidemiológicos realizados en Estados Unidos muestran que la gingivitis aparece en la infancia, es más prevalente y severa en la adolescencia y tiende a remitir en los grupos de edad superiores (Burt 2005). En el I Estudio Nacional sobre la Salud y la Nutrición de Estados Unidos (NHANES I) (1960-62) el 85% de los hombres y el 79% de las mujeres poseían algún grado de gingivitis. Veinticinco años después en el NHANES III (1988-94), el 50% de los adultos presentaban gingivitis en al menos 3 o 4 dientes. Parece, que a pesar de las diferencias en las técnicas de medición, se ha producido una mejoría en la salud gingival de la población entre ambos estudios (Albandar & Kingman 1999).

En Europa, existen sólo dos estudios epidemiológicos que engloban los cambios acontecidos en la salud periodontal Europea durante los últimos 30 años, el estudio noruego (Skudutyte-Rysstad et al. 2007) y el estudio sueco (Hugoson et al. 2008). El primero de ellos (Skudutyte-Rysstad et al. 2007) se basa en los resultados obtenidos en cuatro estudios transversales realizados en Oslo (Noruega) en sujetos de 35 años seleccionados aleatoriamente entre 1973 y 2003. Emplean el CPITN y ortopantomografías. La proporción de sujetos sin pérdida ósea aumenta del 46% en 1973 a 76% en 2003. Además, se produce una reducción estadísticamente significativa en los niveles de placa y cálculo entre ambos periodos de estudio, por lo que los autores concluyen que la salud periodontal en los sujetos analizados ha mejorado en los últimos 30 años.

En el estudio sueco (Hugoson et al. 2008), la población seleccionada se encuentra entre los 20 y 80 años y reside en Jönköping (Suecia). De nuevo está basado en estudios transversales realizados entre 1973 y 2003. En este caso determinan la presencia de placa visible mediante el índice de Silness & Løe (1964) y la presencia de inflamación gingival según el índice de Løe (1967). Definen gingivitis como la presencia de 12 unidades gingivales con sangrado en la región premolar-molar con altura ósea normal. Encuentran que los sujetos con 20-30 años presentaban un 30% de superficies con placa en 1973 frente a un 15,6-20% en 2003. En cuanto a la frecuencia de localizaciones con gingivitis en los sujetos con 30 años fue del 32% en 1993 frente a 17% en 2003. La mayor reducción se encontró en los sujetos con 60 años, en los que el porcentaje de localizaciones con gingivitis fue del 60,2% en 1973 y del 16,4% en 2003.

2.4. Etiología.

Existe suficiente evidencia para afirmar que la causa directa de la gingivitis es la acumulación de placa en la región cervical de los dientes (Loe et al. 1965, Loe et al. 1967, Theilade et al. 1966).

Placa dental o placa bacteriana es el término empleado para definir los depósitos bacterianos en la cavidad oral. La placa se puede acumular supragingivalmente, alrededor de la corona clínica del diente, o subgingivalmente, bajo el margen gingival.

En el año 1965 Loe et al, demostraron en una muestra formada por doce sujetos sanos con excelente higiene oral y con encía clínicamente sana, que el cese del hábito de cepillado dental cursaba con una rápida acumulación de placa en la superficie dentaria. En estos sujetos, se desarrollaba una inflamación en la encía marginal tras 10-21 día sin ningún tipo de técnica de cepillado. Tras la reinstauración de un grado adecuado de higiene oral, los niveles de placa se reducían hasta valores similares a los del inicio del experimento y la encía recobraba su estado de salud clínica.

Un año después, Theilade et al. (1966), publican un nuevo estudio sobre la base del anterior. Encuentran que la tasa individual de desarrollo de la gingivitis está correlacionada con la tasa de acumulación de placa. Observan que el desarrollo de la inflamación clínica coincide con la fase final del desarrollo de la flora de la placa dental en el área específica examinada, de tal forma, que confirman un cambio desde especies de *Streptococcus* y *Actinomyces* en zonas sanas (gram-positivas) hacia fusobacterias (gram-negativas) en zonas con gingivitis.

Los cambios que ocurren en la composición microbiana de la placa supragingival han sido extensamente revisados por Kolenbrander et al. (2006). Así sabemos que en las primeras cuatro horas de formación de placa, los colonizadores tempranos del biofilm son predominantemente cocos gram-positivos y tras ocho horas se empieza a observar la presencia de bacilos. En las 24-48 horas siguientes aparecen gruesos depósitos de células con variadas morfologías tales como cocos, coco-bacilos y bacterias filamentosas. Los estudios iniciales realizados mediante técnica de cultivo encontraban

que los *Streptococcus* representan el 63% de las bacterias aisladas en la placa de 4 horas y el 86% de las bacterias aisladas tras 8 horas (Nyvad & Kilian 1987). La elevada proporción de *Streptococcus* en las fases iniciales se debe a su capacidad de unirse a la película adquirida que recubre la superficie del esmalte, a su menor sensibilidad a la exposición al aire en comparación con otras bacterias orales y a su capacidad para coagregarse con otros *Streptococcus* e incluso con otras bacterias (Kolenbrander et al. 2006).

Estudios recientes en los que se emplean técnicas de biología molecular como la secuenciación y la hibridación ADN-ADN en tablero de ajedrez, que permiten la identificación de bacterias no cultivables, encuentran que en estas primeras fases también están presentes otras bacterias tales como *Actinomyces naeslundii*, *Streptococcus gordonii*, *Eikenella corrodens* y *Neisseria mucosa*, así como bajos niveles de patógenos periodontales, comunmente asociados a peridontitis, como *Treponema denticola*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia* (Kolenbrander et al. 2006, Li et al. 2004). Además, otros estudios han encontrado una variación interindividual en la composición de los colonizadores iniciales de la placa (Kolenbrander et al. 2006).

Con el paso del tiempo, la placa va madurando y la acumulación bacteriana afecta a las condiciones locales creando un estado más reducido, lo que facilita la posterior acumulación de anaerobios gram-negativos. Tras siete días de acumulación de placa se observa un incremento en la proporción de *Fusobacterium nucleatum* (Socransky et al. 1998), bacteria capaz de favorecer la coagregación de diferentes especies bacterianas y que facilitará el desarrollo de la placa dental madura con la llegada de los colonizadores tardíos (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*). Haffajee et al. (2008) han propuesto recientemente la presencia de complejos microbianos en la placa supragingival asociados al estado de enfermedad (Figura 11).

En los últimos años se ha introducido el concepto de biofilm, considerando que la placa dental es un biofilm verdadero en el que las bacterias están inmersas en una matriz compuesta por polímeros bacterianos extracelulares y productos derivados del exudado

gingival y/o de la saliva (Marsh 2004). En la actualidad, el proceso de formación de la placa dental como biofilm está siendo objeto de estudio.

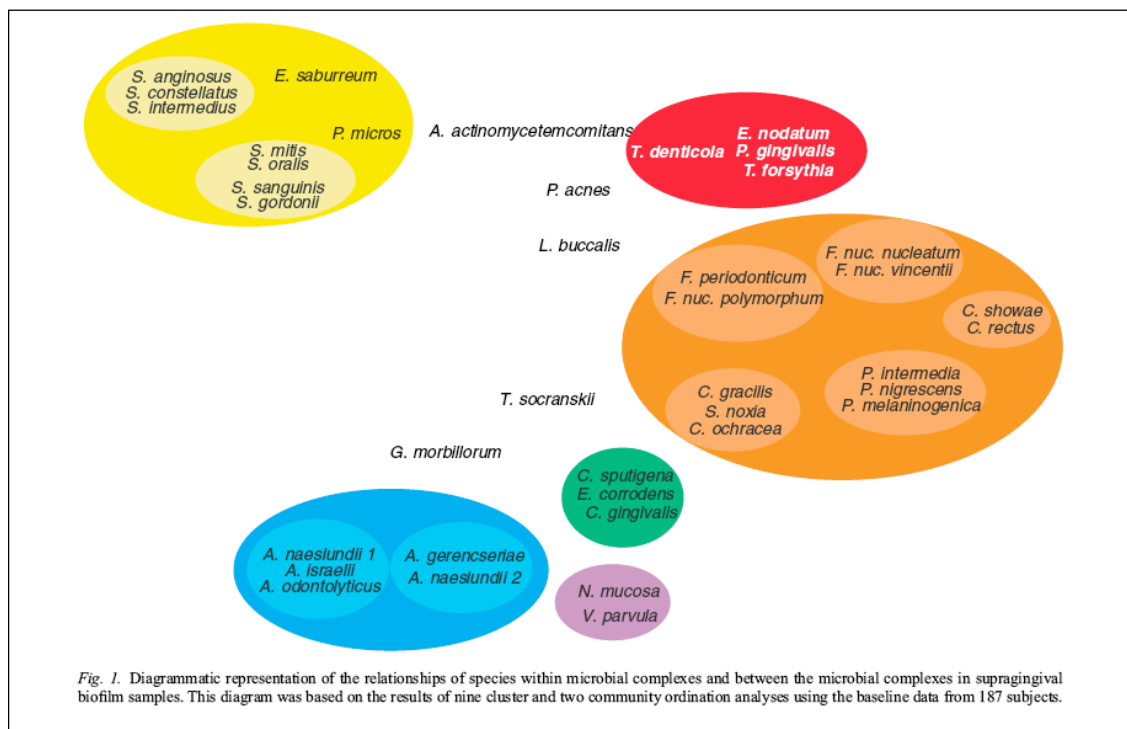


Figura 12: Clusters descritos por Socanskry en la placa supragingival

Resumen, la gingivitis se produce como consecuencia de un desequilibrio entre las condiciones ambientales y los factores asociados al huésped, lo que determina un cambio en la microbiota y permite el sobrecrecimiento de especies virulentas.

A pesar de esto, existe evidencia para afirmar que el nivel y la consistencia de la respuesta gingival a la acumulación de placa varía entre individuos sin diferencias en la acumulación de placa (Abbas et al. 1986), lo que sugiere que esta respuesta de la encía es un rasgo genético posiblemente dependiente de factores relacionados con el huésped, ya sean genéticos o ambientales (Trombelli et al. 2004, Wiedemann et al. 1979).

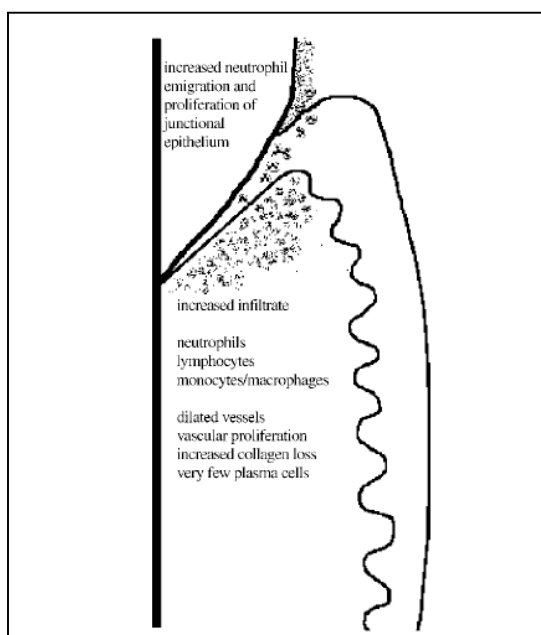
2.5. Histopatología.

El término “encía clínicamente sana” se emplea para describir el nivel de salud gingival que puede alcanzarse en aquellos pacientes que poseen una higiene oral meticulosa. Sin embargo, debido a la presencia continua de productos bacterianos en el surco crevicular, en la encía clínicamente sana existe un pequeño infiltrado de células inflamatorias que afecta al epitelio de unión y al tejido conectivo gingival.

Las localizaciones con encía clínicamente sana se defienden del ataque bacteriano sin progresar hacia gingivitis, gracias a la existencia de mecanismos de defensa tales como el efecto barrera del epitelio de unión, el efecto del flujo continuo del fluido crevicular gingival, la presencia de anticuerpos en el fluido crevicular gingival, la función fagocítica de neutrófilos y macrófagos y el efecto del complemento.

El equilibrio entre los mecanismos de defensa del huésped y los ataques microbianos permite mantener el estado de encía clínicamente sana. La gingivitis aparecerá cuando exista suficiente acumulación de placa, de tal forma que los productos bacterianos induzcan una respuesta inflamatoria importante.

Los cambios morfológicos y funcionales que acontecen en la encía tras la acumulación de placa han sido ampliamente estudiados en perros y humanos (Page & Schroeder 1976). Como consecuencia de estos estudios, en 1976 Page y Schroeder dividen la secuencia de eventos que culmina en la manifestación clínica de gingivitis en tres fases: inicial, temprana y establecida. Tras esta última etapa se desarrollaría la periodontitis, que sería considerada en una fase diferente (avanzada). Actualmente y con los avances en el conocimiento de esta patología, se han producido ciertos cambios en las descripciones iniciales de las lesiones, aunque los nombres de las mismas siguen manteniéndose.

Fase de la lesión inicial**Figura 13:** Lesión inicial.

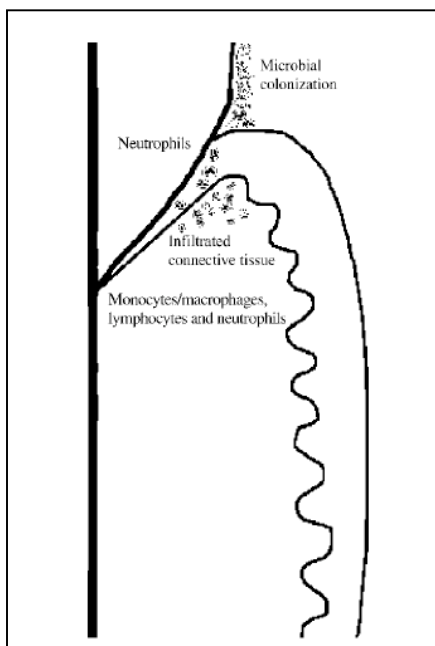
Tras 24 horas de acumulación de placa aparecen importantes cambios en el plexo dentogingival, tales como dilatación de arteriolas, capilares y vénulas, lo que determina la llegada de sangre a la zona. Se incrementa la presión hidrostática dentro de la microcirculación y se forman espacios intercelulares entre células endoteliales adyacentes. Esto va a determinar un incremento en la permeabilidad del lecho vascular, conduciendo a un incremento del exudado de fluidos y proteínas hacia los tejidos.

El flujo del fluido crevicular gingival (FCG) aumenta y las sustancias dañinas liberadas por el biofilm son diluidas en el tejido gingival y en el surco. Además, las bacterias y sus productos son aclarados de la región gingival y acaban en la saliva.

Los polimorfonucleares, gracias a la presencia de moléculas de adhesión (molécula de adhesión intercelular-1(ICAM-1) y molécula de adhesión leucocitaria endotelial-1 (ELAM-1)) y siguiendo un gradiente quimiotáctico, van a migrar desde los vasos sanguíneos hacia el surco crevicular. Los linfocitos, en cambio, gracias al contacto con antígenos, citoquinas o moléculas de adhesión, son retenidos en el tejido conectivo.

Tras 2-4 días de acumulación de placa, la respuesta inflamatoria está bien establecida y es mantenida mediante sustancias quimiotácticas originadas desde la microbiota de la placa así como por células y secreciones del huésped.

Según la descripción inicial de Page y Schroder (1976), esta fase se correspondía con la clásica reacción inflamatoria aguda. Consideraban que en ella, el infiltrado inflamatorio comprendía entre el 5 y el 10% del tejido conectivo gingival. En esa zona se producía una destrucción de colágeno como resultado de la actividad de colagenasas y otras enzimas liberadas por los neutrófilos migrados.

Fase de la lesión temprana**Figura 14:** Lesión temprana

Tras varios días de acumulación de placa los vasos gingivales continúan dilatados, pero su número ha aumentado gracias a la apertura de lechos capilares que se encontraban inactivos. Esto se refleja por un incremento en el enrojecimiento de la encía marginal.

Los linfocitos y los polimorfonucleares siguen siendo las células inflamatorias predominantes, aunque empiezan a aparecer también algunas células plasmáticas según se va expandiendo la lesión. Los fibroblastos muestran signos de degeneración, lo que, junto a la degeneración de las fibras colágenas proporciona espacio para el infiltrado inflamatorio.

Las células basales del epitelio de unión y surcular proliferan en un intento de incrementar la barrera mecánica frente a las bacterias y sus productos. Al mismo tiempo, la porción coronal del epitelio de unión se pierde, permitiendo la formación de un nicho entre el epitelio y la superficie del esmalte, lo que permite la formación de biofilm subgingival.

Esta lesión pueden mantenerse en esta fase durante largos periodos de tiempo y se requiere un tiempo variable entre individuos para desembocar en la aparición de la lesión establecida.

Según la descripción inicial de Page y Schroeder (1976), en esta fase los linfocitos suponen aproximadamente el 75% de la población celular del infiltrado, que ocupa una superficie de entre el 5 y el 15% del tejido conectivo marginal. La pérdida de colágeno en el área afectada es del 60-70% (Page 1986).

Fase de la lesión establecida

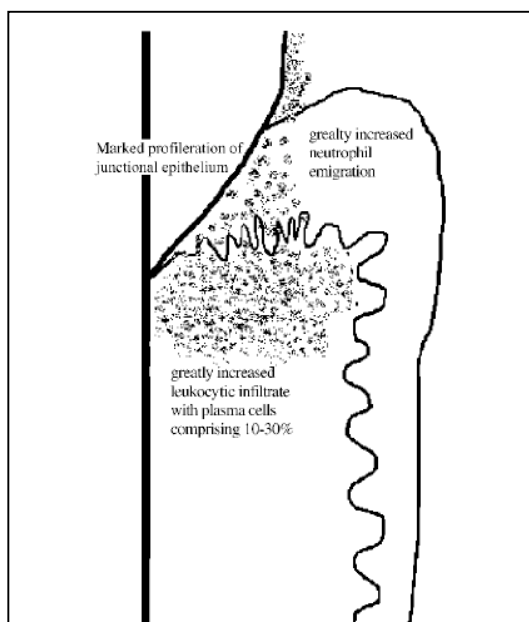


Figura 15: Lesión establecida.

Al mantenerse la acumulación de placa, se incrementa aun más la respuesta inflamatoria del tejido gingival.

El flujo del FCG aumenta. La pérdida de colágeno continúa a la par que se extiende el infiltrado inflamatorio. Esto resulta en zonas libres de colágeno en las porciones más profundas de los tejidos, que permitirán la posterior infiltración y acumulación de leucocitos.

En esta fase, el epitelio dentogingival continúa proliferando y los retepegs se extienden a porciones más profundas de los tejidos. El epitelio de unión, que se va a convertir en epitelio de la bolsa, es ahora más permeable al paso de sustancias hacia el tejido conectivo y puede ulcerarse en ciertas zonas.

Parece que existen dos tipos de lesiones establecidas: una que permanece estable y no progresa durante meses o años y una segunda, más activa y que se convierte más rápidamente en lesión avanzada destructiva.

Según Page y Schoroeder (1976) esta lesión estaba dominada por células plasmáticas. Sin embargo, los estudios más recientes (Fransson et al. 1999) sugieren que existen diferencias en la composición del infiltrado inflamatorio de esta fase en función de la edad. De esta forma, los sujetos mayores (65-80 años) presentan una mayor proporción de células B y una menor proporción de células plasmáticas que los jóvenes (18-25 años).

2.6. Enfermedades gingivales e inflamación

La gingivitis es una lesión inflamatoria de los tejidos blandos que soportan el diente. Como ya hemos dicho, el agente etiológico primario en su iniciación es la acumulación de biofilm bacteriano en el surco crevicular. La irritación de los tejidos gingivales induce una respuesta inflamatoria. El rápido proceso inflamatorio que tiene lugar en la gingivitis es el primer paso para la iniciación de la respuesta inmunológica e inflamatoria global y forma parte del sistema inmunitario innato. La respuesta inmunitaria innata forma parte de la respuesta biológica inherente y no requiere experiencia previa. Vamos a ver más en detalle como se produce este proceso (Kinane 2001, Kornman et al. 1997).

2.6.1. Fases generales del proceso inflamatorio

En situación de salud gingival, las bacterias colonizadoras tempranas de la superficie dentaria son aquellas que se encuentran adyacentes al margen gingival. Entre ellas se incluyen *Streptococcus* facultativos gram-positivos y especies de *Actinomyces*, *Capnocytophaga* y los anaerobios gram-negativos *Fusobacterium nucleatum* y *Prevotella intermedia* (Kornman et al. 1997).

Esta masa microbiana libera grandes cantidades de metabolitos que difunden a través del epitelio de unión. Entre ellos se incluyen ácidos grasos tales como el butírico y el propiónico, que son tóxicos para los tejidos; péptidos del tipo N-formil-metionil-leucil-fenilalanina, que son potentes quimioatrayentes para los leucocitos; y los lipopolisacáridos (LPS) de las bacterias gram-negativas. De esta forma, las células del epitelio de unión sintetizan mediadores inflamatorios, tales como la interleucina 1 β (IL-1 β), la prostaglandina E2 (PGE2) y la metaloproteinasas de la matriz (MMPs), que pueden atravesar el epitelio de unión y entrar en el tejido conectivo. A través de este mecanismo, los vasos se inflaman y se establece un gradiente quimiotáctico que permite la migración de los leucocitos hacia la localización de la placa microbiana, formando una barrera entre ella y el tejido gingival (Kornman et al. 1997). Los neutrófilos poseen mecanismos antimicrobianos altamente especializados que forman la primera línea de defensa frente a las bacterias. Además, secretan mediadores quimiotácticos y vasoactivos que perpetúan la respuesta inflamatoria del huésped (neutrófil-elastasa, β -

Los productos de los macrófagos alteran el ambiente local de diversas formas:

- a) Producen quimioquinas que atraen a nuevos monocitos y linfocitos a la zona.
- b) Los factores producidos por los macrófagos activados in vitro son capaces de favorecer la destrucción del colágeno (MMPs, IL-1 β y PGE2).

c) Los linfocitos T-CD4+ antígeno-específicos se activan gracias a la actividad de los macrófagos. Estos linfocitos se diferencian para producir células T, que ayudan a la diferenciación de las células B y a la producción de anticuerpos. Esto determinará el inicio de la respuesta inmune específica o adquirida y la potencial progresión hacia un estado periodontal irreversible de destrucción de tejidos (periodontitis).

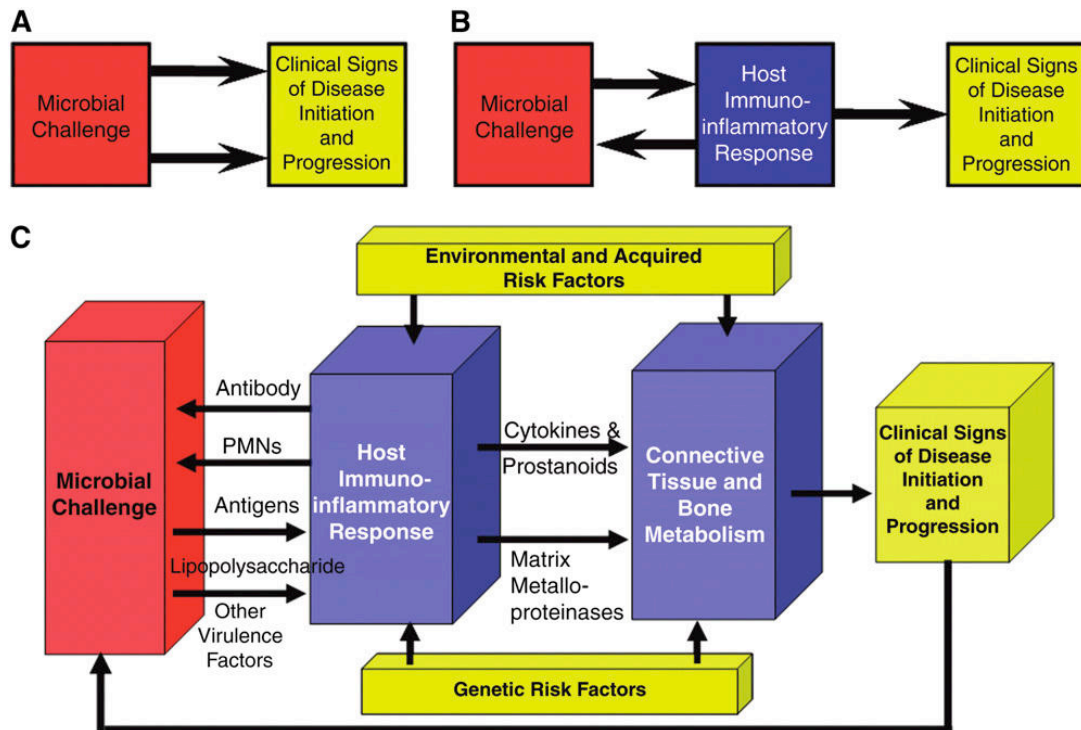


Figura 17: Modelo de etiopatogénesis de las enfermedades periodontales según Konrml et al. 2008.

Vemos, por tanto, que ciertas moléculas de la superficie celular y ciertos productos metabólicos bacterianos son los responsables de la iniciación y desarrollo temprano de la gingivitis. Sin embargo, van a ser los mediadores de la inflamación del huésped los que jueguen un papel fundamental en la amplificación y perpetuación de la destrucción tisular local.

2.6.2. Mediadores de la inflamación

El LPS es un estímulo microbiano clave que desencadena la respuesta del huésped en localizaciones periodontalmente enfermas. De forma local, el LPS induce a los monocitos a liberar mediadores de la inflamación, tales como IL-1 β y PGE2, que como vamos a ver, incrementan la destrucción tisular local de los elementos estructurales del tejido conectivo.

La interleuquina 1 β (IL-1 β) es una citoquina proinflamatoria que juega un papel fundamental en la inflamación aguda y crónica (Delaleu & Bickel 2004, Heasman et al. 1993, Lamster & Ahlo 2007, Masada et al. 1990). Es producida fundamentalmente por monocitos activados, macrófagos, y fagocitos polimorfonucleares, aunque otras células como las epiteliales, los queratinocitos cutáneos, los fibroblastos gingivales, las células B, los osteocitos (Delaleu & Bickel 2004, Heasman et al. 1993), las células de Langerhans y las células *natural killer* son también capaces de secretarlas (Heasman et al. 1993).

La IL-1 β afecta a prácticamente todos los tipos celulares del organismo. Media en la producción de potentes moléculas inflamatorias, tales como las prostaglandinas, leukotrienos, factor activador de las plaquetas y citoquinas así como estimulando la síntesis de moléculas de adhesión a células endoteliales, por lo que afecta a la gran mayoría de los procesos de inmunidad innata. Funciones vitales, tales como el reclutamiento de células inmunes, la proliferación celular, la destrucción tisular, la reabsorción ósea, la contracción de la musculatura lisa vascular, la presión sanguínea y ciertas funciones de las células nerviosas centrales, están reguladas por esta interleuquina (Delaleu & Bickel 2004). Es capaz de regular la producción de otros mediadores, especialmente la PGE2, la diapedesis de los neutrófilos, la proliferación de los linfocitos y la reabsorción ósea inducida por los osteoclastos (Heasman et al. 1993).

La familia de la IL-1 posee dos receptores:

- Un receptor de señal tipo I (IL-1RI), expresado en la mayor parte de las células.
- Un receptor “señuelo” tipo II (IL-1RII), expresado fundamentalmente en las células B.

Para que se produzca el proceso de señalización de la IL-1 se forma un complejo terciario constituido por IL-1, IL-1RI y una proteína accesoria al receptor de IL-1 (IL-1Racp). La señal se transmite vía descendente a través de diferentes componentes entre los que se incluyen: Myd88, una kinasa asociada al receptor de IL-1 y TRAF6, encargado de transmitir la señal a través de la kinasa inducida NF- κ B a otras dos kinasas (IKK-1 e IKK-2), lo que lleva a la activación de NF- κ B y a su traslocación al núcleo (Delaleu & Bickel 2004).

La prostaglandina E2 (PGE2) es un derivado del ácido araquidónico. Es producida por diferentes tipos celulares, pero la principal célula responsable de iniciar el metabolismo de las ciclooxigenasas en las infecciones periodontales es el monocito (Heasman et al. 1993).

Es un potente vasodilatador, activador de la secreción de colagenasas por monocitos y fibroblastos y, en altas concentraciones, un potente estimulador de la reabsorción ósea *in vitro* e *in vivo*. Juega un importante papel en la inflamación periodontal, al incrementar la permeabilidad y la dilatación de la microvasculatura y estimular la respuesta inflamatoria, por lo que es considerada un mediador pro-inflamatorio (Heasman et al. 1993, Lamster & Ahlo 2007).

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) que bloquean la síntesis de prostaglandinas a través de la inhibición de la ciclo-oxigenasa, tienen la capacidad de impedir la pérdida ósea, la pérdida de inserción, el enrojecimiento gingival, y el sangrado al sondaje asociado a la enfermedad periodontal en animales y humanos (Williams et al. 1989). Por ello se ha sugerido que el incremento en los niveles de prostaglandina en el tejido gingival estimula la progresión de la enfermedad periodontal.

2.6.3. Potencial diagnóstico del fluido crevicular gingival (FCG)

De lo dicho hasta ahora, se deduce que estudio de la respuesta del huésped puede proporcionar un mecanismo adicional para monitorizar la progresión de la inflamación gingival en humanos. Sin embargo, la recolección y análisis de sangre periférica y tejido gingival no ofrece un opción práctica. Por contra, el análisis del fluido originado en el surco gingival es una forma no invasiva de estudiar la respuesta del huésped mediante el análisis de sus componentes (Lamster & Novak 1992).

El fluido crevicular gingival (FCG), un transudado del suero o un exudado inflamatorio, puede ser recolectado del surco gingival que rodea los dientes (Lamster & Ahlo 2007). Su composición resulta de la interacción entre el biofilm bacteriano adherido a la superficie dentaria y las células de los tejidos periodontales. Su recolección es un proceso mínimamente invasivo y el análisis de sus constituyentes específicos proporciona una indicación bioquímica cuantitativa del metabolismo celular local, que refleja el estado de salud periodontal de una persona (Champagne et al. 2003).

En las localizaciones sanas, el FCG representa un transudado del suero, que fluye hacia el surco crevicular como resultado de un gradiente osmótico (Champagne et al. 2003 y Griffiths 2003). En localizaciones con inflamación, el FCG se convierte en un exudado inflamatorio que llega al surco crevicular como consecuencia del aumento en la permeabilidad de los vasos sanguíneos subyacentes al epitelio de unión y sulcular (Champagne et al. 2003).

El potencial diagnóstico del FCG proviene de un estudio realizado en los años 50 (Brill & Krasse 1958) en el que se demostró que una tira de papel colocada en el surco gingival de animales de experimentación podía detectar una tinción inyectada en la circulación sistémica (Lamster & Ahlo 2007). En la actualidad, el método de elección para la toma de muestras de FCG es la inserción de una tira de metilcelulosa en el surco. El papel absorbe el fluido, que es posteriormente eluido y analizado (Lamster & Ahlo 2007).

La determinación del volumen de FCG se realiza mediante un dispositivo electrónico denominado Periotron®, que determina la capacitancia eléctrica de una tira de papel mojada. Posee dos vainas metálicas que actúan como pletinas de un condensador eléctrico. El campo eléctrico creado por cargas opuestas en las vainas induce la polaridad de las moléculas, lo que reduce la diferencia de potencial entre las vainas e incrementa la capacitancia. Por tanto, cuanto mayor sea el número de moléculas polares entre las vainas, mayor será la capacitancia y mayor será la lectura del Periotron (Ciantar & Caruana 1998, Griffiths 2003).

Existen tres modelos de Periotron® (600, 6000 y 8000), siendo el 8000 el más moderno de los tres y el que permite medir un mayor rango de volúmenes (0,1-1,2µl). Es importante considerar que cada máquina de Periotron requiere realizar su propia calibración (Chapple et al. 1995, Chapple et al. 1999, Preshaw et al. 1996). Los modelos 600 y 6000 se calibran mediante una recta de regresión lineal (Chapple et al. 1995, Preshaw et al. 1996), mientras que el 8000 se calibra mediante un polinomio de cuarto orden (Ciantar & Caruana 1998, Chapple et al. 1999). Para realizar la calibración es recomendable emplear suero, una jeringa que nos permita estandarizar los volúmenes, el empleo de mediciones duplicadas y un rango completo de volúmenes desde 0,1 a 1,2µl (Chapple et al. 1995, Preshaw et al. 1996, Griffiths 2003). De esta manera se puede obtener la correspondencia entre los valores de capacitancia electrónica registrado por el Periotron (denominados “unidades periotron”) y el volumen de FCG correspondiente.

El volumen del FCG en una localización determinada puede estar directamente relacionado con el grado de inflamación tisular (permeabilidad vascular y la naturaleza del infiltrado inflamatorio) así como con la permeabilidad y ulceración del epitelio crevicular. Las localizaciones con mayor grado de inflamación poseen mayor volumen de FCG que las menos inflamadas, aunque los estudios no encuentran una relación entre el incremento en el volumen de FCG y el incremento en el riesgo de destrucción tisular (Stewart et al. 1993, Griffiths 2003, Lamster & Ahlo 2007).

Uno de los principales problemas en la toma de muestras de FCG es la contaminación con sangre, saliva o placa. La contaminación con sangre se evita desechando aquellas muestras con sangre visible y eliminando esos datos del análisis (Griffiths 2003).

La presencia de placa o saliva en la tira de papel incrementa el volumen de FCG. Los estudios recomiendan retirar la placa y aislar la zona con rollitos de algodón antes de tomar las muestras (D'Aoust & Landry 1994, Griffiths 2003, Griffiths et al. 1992, Stoller et al. 1990).

Los componentes del huésped que forman parte del FCG se agrupan en tres grandes categorías: (1) enzimas liberadas por células del tejido conectivo constitutivas o inflamatorias, (2) productos de la degradación tisular o celular y (3) citoquinas inflamatorias, mediadores y otros productos secretados por las células inflamatorias o por otras células del huésped (células del epitelio de unión) (Offenbacher et al. 1993). Este tercer punto va a ser el principal objeto de nuestro análisis.

2.6.4. IL-1 β y PGE2 en FCG

La presencia de IL-1 β en FCG fue por primera identificada por Charon et al. (1982) mediante bio-ensayos. Ocho años más tarde, Masada et al. (1990) emplea el análisis enzimático ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assays*) para detectar IL-1 β en pacientes con periodontitis avanzada no tratada. En el caso de la PGE2, su presencia en FCG fue por primera vez determinada por Goodson et al. (1974). En 1981 Offenbacher introduce el radio-inmunoanálisis para detectarla, pero no es hasta 1992, que Nelson estandariza la técnica de ELISA para determinar PGE2 en FCG (Nelson et al. 1992).

Desde entonces se han publicado múltiples estudios transversales, que han establecido los niveles de IL-1 β y PGE2 en pacientes sanos, con gingivitis y con periodontitis (Salvi et al. 1997, Masada et al. 1990, Ishishara et al. 1997, Figueredo et al. 1999, Faizuddin et al. 2003, Zhong et al. 2007) (tablas 4 y 5). En general se observa que los niveles de ambos mediadores son superiores en situaciones de enfermedad periodontal en comparación con situaciones de salud. Salvi et al. (1997) encuentran que la concentración de IL- β en sujetos sanos era de 16.8 ng/ml (n=21); en casos de gingivitis (n=22) de 115.8 ng/ml; en casos de periodontitis del adulto (n=17) 263.2 ng/ml y en casos de periodontitis juvenil 836.8 ng/ml (n=13). Seymour & Henderson 2001 (2001) describen resultados similares para las concentraciones de PGE2 con

valores de 20.3 ng/ml en sujetos sanos (n=21); de 49.4 ng/ml en sujetos con gingivitis (n=28); de 42.3 ng/ml en sujetos con periodontitis del adulto (n=21) y de 81.6 ng/ml en casos de periodontitis juvenil (n=15).

Sin embargo, estos resultados no son compartidos por todos los autores. Yücel et al. (2008) al medir la cantidad de IL-1 β en dientes anteriores encuentra que es superior en los sujetos con periodontitis crónica (40,66pg), que con gingivitis (23,58 pg) o sanos (10.23pg). Sin embargo, las concentraciones de IL-1 β no son DES entre los grupos (20.82ng/ml; 39.80 ng/ml; 23.30 ng/ml en PC, G o sanos, respectivamente).

Autor, año (IL-1 β)	Salud	Gingivitis	Periodontitis
Salvi, 1997	16,8 ng/ml	115,8 ng/ml	263,2 ng/ml
Figueredo, 1999	---	2,9 (3,2) pg	9,0 (5,3) pg*
Rawlison, 2000	0,01 (0,01) ng/ml		0,11 (0,14) ng/ml
Giannopoulou, 2003	6,90 pg	19,5 pg*	43 pg*
Faizuddin, 2003	0,013 ng/ml	0,072 ng/ml*	0,397 ng/ml*
Orozco, 2006	---	139,10 (26,90) ng/ μ g	241,40 (39,50) ng/ μ g
Yücel, 2008	10,23 pg 23,80 ng/ml	23,58 pg 39,80 ng/ml	40,66 pg* 20,82 ng/ml

Tabla 4: Niveles de IL-1 β en FCG de paciente sanos, con gingivitis o con periodontitis crónica descritos en estudios transversales.

* Diferencias estadísticamente significativas con gingivitis o con salud.

Autor, año (PGE)	Salud	Gingivitis	Periodontitis
Nakashima, 1994	2,1 pg 5 ng/ml	4 pg 6 ng/ml	14 pg* 10,5 ng/ml*
Tsai, 1998		1,23 (0,91) pg 9,42 (6,59) ng/ml	86,75 (187,47) pg* 152,20 (243,54) ng/ml*
Heasman, 1993		54,94 (4,06) ng/ml	41,57 (2,91) ng/ml
Seymour, 2001	20,3 ng/ml	49,4 ng/ml	42,3 ng/ml

Tabla 5: Niveles de PGE2 en FCG en pacientes sanos, con gingivitis o con periodontitis crónica descritos en estudios transversales.

* Diferencias estadísticamente significativas con gingivitis o con salud.

Se han realizado también estudios longitudinales que han establecido los cambios en los niveles de estos dos mediadores con el tiempo y el efecto del tratamiento. Entre ellos, destaca el de Offenbacher et al. (1986), en el que se estableció que la concentración de PGE2 es elevada en FCG cuando la pérdida de inserción clínica es inminente. Se ha sugerido un límite de 66,2ng/ml para definir un test screenig positivo o negativo con la intención de identificar pacientes de riesgo. Pacientes con niveles de PGE2 dos desviaciones estándar superiores a las de los individuos sanos tienen 47 veces más probabilidades de tener pérdida de inserción en alguna localización (Offenbacher et al. 1986).

Sin embargo, los estudios longitudinales en pacientes con gingivitis son poco abundantes en la literatura, ya que el estudio de estos dos mediadores se ha centrado más en su papel como potencial factor de riesgo de pérdida de inserción en pacientes con periodontitis. Existen dos estudios clásicos a este respecto, el de Kinane et al. (1992) y el de Heasman et al. (1993). En ambos se estudia la variación en los niveles de estos mediadores a lo largo de un proceso de gingivitis experimental.

Kinane et al. (1992), permiten la acumulación de placa a lo largo de un periodo de 14 o 21 días en dos grupos con 6 estudiantes cada uno. Se toman muestras de FCG en el surco distovesibular de ambos incisivos centrales superiores en basal y cada 4 días (14 días) o 7 días (21 días). Se observa un incremento en la concentración de IL-1 β de forma paralela a la acumulación de placa y de forma previa a la inflamación gingival (desde 0,19 \pm 0,05 ng/ μ l a 0,95 \pm 0,23 ng/ μ l) y una correlación positiva entre el índice gingival y los niveles de IL-1 β . Sin embargo, es importante destacar la amplia variación intersujeto en las cantidades de IL-1 β registradas.

Posteriormente, Heasman et al. (1993) repiten el mismo modelo experimental pero a lo largo de un periodo de 28 días. Toman muestras de FCG en mesiovestibular y distovestibular de premolares y mesiovestibular de primeros molares. Encuentran que el sangrado al sodaje aumenta hasta el 5% en las primeras tres semanas y llega a 25% en la cuarta. El enrojecimiento aumenta de forma lineal: 40%, 59%, 83% y 100% en la primera, segunda, tercera y cuarta semana.

La concentración de IL-1 β en FCG en basal fue de 16,5 \pm 9,3ng/ml al inicio del estudio y aumenta hasta 131 \pm 76,0 ng/ml tras la primera semana (diferencias estadísticamente significativas). A partir de este momento continúa siempre más elevada que al inicio del estudio. En cuanto a los niveles de PGE2, éstos permanecen relativamente constantes durante 21 días (20,5 \pm 7,6 ng/ml) y en la cuarta semana aumentan hasta alcanzar concentraciones de 53,5 \pm 5,2 ng/ml.

Como consecuencia de estos resultados, los autores proponen la existencia de una respuesta en doble ola durante la fase de inflamación gingival. La primera ola se corresponde con el inicio de la inflamación clínica en el 40% de las localizaciones. En esta fase predomina la liberación de IL-1 β y leucotrienos B4, lo que coincide con el desarrollo de la lesión temprana, caracterizada por una intensa reacción neutrofílica, por la acumulación de algunos monocitos y por el inicio de las alteraciones citopáticas en los fibroblastos gingivales. En esta fase inicial la IL-1 β ejercería un efecto proinflamatorio temprano, estimulando la proliferación epitelial, induciendo la secreción de collagenasa por monocitos y fibroblastos, y estimulando a los fibroblastos periodontales y gingivales a producir PGE2. Por tanto, los mediadores liberados en esa fase resultan de la estimulación y activación de las zonas anatómicamente más superficiales de la lesión gingival (epitelio).

La segunda ola, incluye la producción de PGE2 y tromboxano B2. Ocurre más tardíamente, aproximadamente en la semana cuarta. En este momento, se habla desde un punto de vista histopatológico de lesión establecida, caracterizada por la presencia de neutrófilos, monocitos y linfocitos, algunos de los cuales se transformarán en células plasmáticas. En esta fase se ha multiplicado por cinco el porcentaje de localizaciones con sangrado al sondaje. Además se ha producido un cambio de una flora gram-positiva a una gram-negativa. Ese incremento en la complejidad de la microbiota puede ser el factor primario responsable de la activación del eje monocítico/linfocítico anatómicamente más profundo

Otros autores han repetido estos modelos experimentales y todos ellos confirman el incremento de los niveles de IL-1 β a lo largo del periodo de estudio (Deinzer et al. 2004, Gonzales et al. 2001, Johnson et al. 1997), la ausencia de cambios en los niveles

de PGE2 en las primeras tres semanas (Deinzer et al. 2004, Gonzales et al. 2001, Johnson et al. 1997) y su elevación en la cuarta semana (Johnson et al. 1997).

Sin embargo, es importante señalar que los valores obtenidos en estos estudios de gingivitis experimental no pueden extrapolarse de forma directa a los casos de gingivitis crónica, ya que los sujetos con gingivitis experimental desarrollada lo largo de cuatro semanas poseen mayor acumulación de placa, mayor cantidad de IL-1 β y menor cantidad de IL-8 que los sujetos con gingivitis crónica (Deinzer et al. 2007). Parece por tanto, que en la gingivitis experimental se observa una fluctuación en los parámetros clínicos e inmunológicos que no se observa en la gingivitis crónica.

3. EMBARAZO Y ENFERMEDADES GINGIVALES

3.1. Introducción.

Estudios clínicos transversales (tabla 7) y longitudinales (tabla 8) han descrito un incremento en la prevalencia y severidad de la inflamación gingival durante el embarazo, que desaparece tras el parto sin producir daños irreversibles en la inserción periodontal (Cohen et al. 1969, Cohen et al. 1971, Gursoy et al. 2008, Hugoson 1970, 1971, Løe 1965, Loe & Silness 1963, Lundgren & Lindhe 1971, O'Neil 1979b, Tilakaratne et al. 2000). Más aún, en un estudio sobre gingivitis experimental, Raber-Durlacher et al. (1994) encontraron mayor inflamación, sangrado y enrojecimiento, cuando la gingivitis se inducía durante el embarazo, que cuando se inducía 25 semanas tras el parto.

Clásicamente, esta inflamación gingival que tiene lugar durante el embarazo, se ha conocido con el nombre de **gingivitis gravídica**. Clínicamente se caracteriza por una encía intensamente enrojecida que sangra fácilmente, por un engrosamiento del margen gingival y por hiperplasia de las papilas interdentes que pueden dar lugar a la aparición de pseudobolsas (Amar & Chung 1994, Laine 2002, Sooriyamoorthy & Gower 1989).

Según la clasificación actual de las enfermedades periodontales (Asociación Americana de Periodoncia, 1999), la gingivitis gravídica se engloba dentro de las enfermedades gingivales inducidas por placa y modificadas por factores sistémicos (Armitage 1999). Se considera que sus características son similares a las de la gingivitis inducida sólo por placa, salvo por la propensión a desarrollar signos manifiestos de inflamación en presencia de cantidades relativamente escasas de placa (Mariotti 1999).

Desde un punto de vista **histológico**, la gingivitis gravídica se considera una inflamación proliferativa, vascular e inespecífica con un amplio infiltrado inflamatorio celular. En 1949, Maier y Orban, exploran a 530 mujeres que se encuentran entre el 3º y el 5º mes de embarazo. En 53 de los casos toman biopsias gingivales y su análisis revela que se trata de “una inflamación proliferativa caracterizada por numerosas figuras mitóticas en el epitelio, endotelio y tejido conectivo. Existe hialinización del epitelio,

formación de perlas en los rete pegs, alteración en el proceso de hornificación, formación de microabscesos, acumulación de linfocitos y linfoblastos e inflamación ulcerativa pseudomembranosa”. Los autores concluyen que ninguno de los signos son característicos exclusivamente de la gingivitis del embarazo.

La **prevalencia** de la gingivitis gravídica varía entre el 36% (Maier & Orban 1949) y el 100% (Loe & Silness 1963) de las embarazadas con gingivitis previa. Sin embargo, la incidencia de gingivitis es de tal sólo 0,03% en aquellas mujeres libres de placa al inicio del embarazo y que mantienen buenos hábitos de higiene oral durante el mismo (Chaikin 1977). Por lo tanto, parece que no son sólo los niveles hormonales los responsables de estos cambios. De este modo, aunque se ha intentado establecer una correlación entre los niveles de hormonas durante el embarazo y el incremento en la inflamación gingival que acontece durante el mismo, los resultados aportados por los diferentes autores son contradictorios (Cohen et al. 1969, Hugoson 1971, Jonsson et al. 1988, Muramatsu & Takaesu 1994, O'Neil 1979b, Samant et al. 1976, Silness & Loe 1964).

Durante el embarazo también se ha descrito la aparición del **granuloma gravídico**, conocido como tumor del embarazo. Es una reacción inflamatoria proliferativa fibrovascular exagerada con relación a un estímulo ordinario localizada fundamentalmente en la encía. Se describe como una masa localizada roja o roja-amorata, nodular o ulcerada que sangra fácilmente y que aparece frecuentemente en mujeres (0,5-5%) en torno al segundo trimestre de embarazo y crece a lo largo del mismo alcanzando un tamaño que no suele superar los 2 cm (Ojanotko-Harri et al. 1991, Yuan et al. 2002).

Gingivitis inducida sólo por placa	Gingivitis gravídica
Placa presente en el margen gingival.	Placa presente en el margen gingival.
La enfermedad comienza en el margen gingival	Respuesta gingival inflamatoria exagerada
Cambio en el color de la encía	Inicio durante el embarazo
Cambio en el contorno de la encía	Cambio en el color de la encía
Cambio en la temperatura sulcular	Cambio en el contorno de la encía
Incremento en el exudado gingival	Incremento en el exudado gingival
Sangrado al sondaje	Sangrado al sondaje
Ausencia de pérdida de inserción	Ausencia de pérdida de inserción
Ausencia de pérdida ósea	Ausencia de pérdida ósea
Cambios histológicos	Cambios histológicos
Reversible tras la eliminación de la placa	Reversible tras el parto

Tabla 6: Principales diferencias entre la gingivitis inducida por placa y la gingivitis gravídica. Modificada de Mariotti, 1999.

3.2. Asociación epidemiológica

Los primeros casos de respuestas gingivales exageradas durante el embarazo fueron descritos en el siglo XIX (Eiselt 1840; Pinard 1877).

Ya en el siglo XX, Monash (1926) estudia 6 casos de gingivitis del embarazo y propone el término “*proliferative gingivitis of pregnancy*”. En 1933, Ziskin, Blackberg y Stout, son los primeros en sugerir la existencia de una correlación entre los niveles de hormonas y la gingivitis.

En 1949 Maier y Orban, tras explorar a 530 mujeres embarazadas entre el 3º y el 5º mes de embarazo, observan un incremento en la intensidad de la gingivitis crónica preexistente. Concluyen que los cambios en los niveles hormonales, aunque capaces de influenciar la severidad de la inflamación gingival, no son los factores iniciadores.

Los trabajos publicados por Løe y Silness (1963, 1964, 1965) marcan el inicio de una nueva etapa. Se trata de una serie de estudios transversales en el que exploran a 121 mujeres embarazadas y a 61 mujeres, dos y cinco meses tras el parto. En todas ellas registran los valores de la profundidad de sondaje y los índices de placa y gingival en seis dientes (1.6, 1.2, 2.4, 2.6, 3.2 y 4.4). Los resultados muestran que el 100% de las embarazadas presentan cambios gingivales a los que puede denominarse gingivitis. Según sus resultados, los primeros signos clínicos de inflamación gingival aparecen en el segundo mes del embarazo y continúan incrementando hasta alcanzar el pico máximo de severidad en el octavo mes. En el último mes del embarazo observan cierta mejoría y dos meses tras el parto los niveles de índice gingival son similares a los del segundo mes del embarazo. Analizan también los datos en función del tipo de diente y de la localización, y encuentran que, aunque los molares presentan los mayores valores del índice gingival, la mayor variación en el mismo se encuentra en los incisivos. En cuanto a los valores de profundidad de sondaje observan bolsas más profundas durante el embarazo que tras el parto (3,2mm frente a 2,6mm), lo que explican por una inflamación del margen gingival que no causaría daños irreversibles en el periodonto.

A partir de este momento se suceden los estudios, tanto transversales como longitudinales, que tratan de entender qué ocurre con la salud gingival en las pacientes

gestantes. Hay que destacar por su importancia los estudios longitudinales realizados por Hugoson (1971), Cohen et al. (1969, 1971) y más recientemente, Tilakaratne et al. (2000) y Gursoy et al. (2008).

Cohen et al. (1969) mediante el estudio del índice de enfermedad periodontal, determinan que existen diferencias estadísticamente significativas en el componente gingival de dicho índice entre los diferentes trimestres del embarazo ($p < 0,01$), encontrando el pico máximo en el tercer trimestre (2,57). El máximo valor del componente gingival lo encuentra en la zona antero-inferior, y el mínimo, en la zona ántero-superior.

Hugoson (1971) encuentra valores del índice gingival similares a los de Løe y Silness (1963), que alcanzan el pico máximo en el tercer trimestre del embarazo (1,34), y que caen tres meses tras el parto. Los mayores valores del índice gingival aparecen en los molares y en las zonas interproximales.

Arafat (1974), encuentra un ligero incremento en el índice periodontal en el segundo trimestre del embarazo, sin embargo, es uno de los pocos autores que no encuentra diferencias estadísticamente significativas a lo largo del embarazo.

Samant et al. (1976) observan un incremento estadísticamente significativa en el índice gingival del primer al segundo trimestre del embarazo, donde encuentran el pico máximo (1,04), siendo este pico inferior al que encontraban los autores anteriores. En el tercer trimestre los valores del índice caen ligeramente, aunque siguen siendo superiores a los del primer trimestre. Las mujeres embarazadas presentan un valor del índice gingival significativamente superior que las no embarazadas. Además observan un incremento en la severidad de la inflamación gingival a lo largo del embarazo (del 2,5% al 10% de las localizaciones presentan gingivitis severa en el primer y el tercer trimestre, respectivamente).

O'Neil (1979), sólo aporta datos correspondientes al índice gingival del primer y tercer trimestre y encuentra un incremento significativo a lo largo de ese periodo, con valores muy parecidos a los de Hugoson (1971) (1,32).

En el estudio de Kornman & Loesche (1980) los valores del índice gingival sólo se refieren a las dos localizaciones seleccionadas (cara mesial del segundo premolar superior derecho y del canino inferior izquierdo), por lo que no pueden compararse con los del resto de los estudios. A pesar de ello, se observa un incremento en dicho índice, con pico en el tercer trimestre.

Zaki et al. (1984), no determina si existen diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes periodos del embarazo, si no que sólo compara los valores con los de un grupo de mujeres no embarazadas. Encuentra que en el primer trimestre no existen diferencias significativas entre embarazadas y controles, mientras que sí que existen en el segundo y tercer trimestre.

Muramatsu & Takaesu (1994) determinan que existe un incremento estadísticamente significativo entre el número de localizaciones con inflamación entre el tercer y el primer mes, el noveno y el cuarto mes y entre el sexto y el noveno mes del embarazo.

Tilakaratne et al. (2000), observan que el índice gingival incrementa de forma significativa en cada uno de los trimestres del embarazo, siendo el tercer trimestre el momento con el máximo valor (1,43), con datos ligeramente superiores a los encontrados hasta ese momento. Tras el parto, el índice gingival cae de forma significativa.

Yalcin et al. (2002a, 2002b) presenta dos estudios que nos permiten comparar la evolución del índice gingival con y sin RAR. Sin RAR (Yalcin et al. 2002a) observan un incremento estadísticamente significativo del índice gingival a lo largo del embarazo, con un pico máximo en el tercer trimestre del mismo (1,99), mientras que con RAR (Yalcin et al. 2002b) se produce una reducción significativa del mismo (1,59). Se puede ver, que a pesar de haber recibido tratamiento periodontal las pacientes no muestran una gran reducción en el índice gingival, que está incluso por encima del valor de otros estudios previos. Hay que considerar que este autor presentaba los valores más elevados de índice de placa a lo largo del estudio, a pesar de que las pacientes reciben tratamiento periodontal. Sin embargo, los valores medios de profundidad de sondaje son de 2,85mm en el primer trimestre del embarazo.

El estudio de Taani et al. (2003), es el que refleja los valores más elevados de índice gingival a lo largo embarazo y aquí de nuevo el pico máximo se encuentra en el tercer trimestre (2,60).

Por último, el estudio de Gursoy et al. (2008) muestra los valores del porcentaje de localizaciones con sangrado al sondaje. Los encuentran más elevados en el embarazo que en el postparto con un pico máximo en el segundo trimestre (34%), de forma similar al estudio de Samant et al. (1976).

A continuación aparecen reflejados los principales hallazgos encontrados en la literatura en relación con los cambios clínicos observados en mujeres gestantes. Los artículos han sido divididos en base a que presentaran un diseño transversal (tabla 7) o longitudinal (tabla 8).

Autor, año	País	(E) / (NE)	Resultados
Løe, 1963	Noruega	121 / 61	Prevalencia gingivitis: 100% Pico de IG en el tercer trimestre. Incremento de PS durante el embarazo que disminuye tras el parto
Silness, 1964	Noruega	121 / 61	Los niveles de índice de placa no cambian a lo largo del embarazo.
Arafat, 1974	EEUU	477 / 233	Prevalencia gingivitis: 76,6% No encuentra diferencias significativas en el IG a lo largo del embarazo.
Samant, 1976	India	120/ 40	Prevalencia: 89,1%. Pico máximo de IG en el 2º trimestre. Incremento en el % de localizaciones afectadas en el embarazo.
Conde Vidal, 1981	España	60 /0	Prevalencia gingivitis: 51,67%.
Zaki, 1984	Egipto	30 /10	Compara con no-embarazadas: diferencias en 2º y 3º trimestre.
Jonsson, 1988	Canadá	30/30	No encuentra correlación entre parámetros clínicos con progresión de embarazo ni niveles hormonales,
Miyazaki, 1991	Japón	2424 / 1565	Prevalencia gingivitis: 95%
Muramatsu, 1994	Japón	19 / 20	Incremento progresivo en el número de localizaciones con inflamación. No correlación con niveles hormonales
Machuca, 1999	España	130	Asociación entre índice de sangrado y nivel profesional bajo
Taani, 2003	Jordania	200/200	Pico máximo en 3º trimestre Incremento en PS.

Tabla 7: Estudios transversales sobre la gingivitis gravídica.

E: embarazo; NE: No embarazo; IG: índice gingival; PS: profundidad de sondaje.

Autor, año	País	E / NE	Seguimiento	Resultados
Cohen, 1969	EEUU	E: 16	1º, 2º, 3º T, 3m PP	Pico de IG en 3º trimestre.
Hugoson, 1971	Suecia	E: 26	E: 12, 18, 24, 30, 34 y 38 s PP: 1-3 d, 8 y 20 s	Prevalencia: 100% Pico de IG en 3º trimestre. Incremento en PS durante embarazo y cae tras parto. Correlación hormonales e IG.
Chaikin 1977	EEUU	E: 267S y 152G/PE	Mensualmente hasta 11 m PP	Prevalencia gingivitis: 36% Mal control placa: 66%; Buen control placa: 0,03%
O'Neil, 1979	Inglaterra	E: 26	Semana 14 y 30	Incremento de IG a lo largo del embarazo No correlación hormonas e IG.
Kornman, 1980	EEUU	E: 20 NE: 11	E: cada mes NE: 4 meses	Pico de IG en 3º trimestre
Kinnby, 1996	Suecia	E: 14	3ºT y 3m PP	Diferencia dos grupos con alta o baja reactividad frente a la placa
Tilakaratne 2000	India	E: 47 NE: 47	1, 2, 3 T, 3m PP	Pico en el 3º trimestre Sin cambios en PS
Yalcin, 2002a	Turquía	E: 61	1, 2, 3 T	Pico en el 3º trimestre Incremento en PS
Yalcin, 2002b	Turquía	E: 22	1, 2, 3 T	Efecto del RAR: escasa reducción de IG. Reducción de PS
Lieff, 2004 OCAP	EEUU	E: 903	<25 semanas y 48h PP	Prevalencia gingivitis: 71,9%.
Gursoy, 2008	Finlandia	E: 24 NE: 22	E: 1, 2, 3T, 2s PP y tras lactancia NE: 1, 2, 3 y 4m	Incremento en el % localizaciones con sangrado y en nº de gestante con PS>4mm.

Tabla 8: Estudios longitudinales sobre la gingivitis del embarazo.

E: embarazo; NE: no embarazo; IG: índice gingival; PS: profundidad de sondaje; m: mes; PP: Post-parto; h: horas; d: días; s: semanas; T: trimestre; RAR: raspado y alisado radicular.

3.3. Papel de las hormonas sexuales en la patogénesis de la gingivitis gravídica

Aunque parece que durante el embarazo la susceptibilidad de los tejidos gingivales a la inflamación está relacionada con los cambios en la concentración y en la proporción de progesterona y estradiol (Vittek et al. 1979, Lapp & Lapp 2005, Machtei et al. 2004), el mecanismo exacto por el cual estas hormonas incrementan la inflamación gingival se desconoce. Como se ha explicado anteriormente el cambio hormonal más significativo es el incremento en la producción de estrógeno y progesterona. Tras el parto se produce una caída brusca en los niveles de ambas hormonas y en 2 o 3 días aproximadamente las concentraciones hormonales alcanzan los niveles de una mujer no embarazada (González-Merlo et al. 2006, Guncu et al. 2005, Mariotti 1994)

Como consecuencia de la necesidad de encontrar el “factor” etiológico que pudiera explicar la respuesta gingival exagerada observada durante el embarazo, diferentes autores han sugerido la existencia de una potencial correlación entre los elevados niveles hormonales característicos del embarazo y los valores del índice gingival (Zaki et al. 1984).

Hugoson (1971) encuentra una relación significativa entre el índice gingival y los niveles de hormonas sexuales femeninas (progesterona y estradiol) en plasma ($p < 0,001$). Sin embargo, los valores de hormonas que emplean son la resultante de la media ponderada de dos estudios previos (Schwers 1964, Johansson 1969), por lo que este dato de correlación no puede considerarse como válido. Posteriormente, O’Neil (1979) no encuentra correlación entre los niveles de hormonas en sangre y los valores del índice gingival.

También se han empleado los niveles de hormonas en saliva en un intento de establecer correlaciones con el índice gingival. Sin embargo, ninguno de los autores (O’Neil (1979), Jonsson (1988), Muramatsu (1994)) que lo han empleado han logrado obtener valores estadísticamente significativos, aunque bien es cierto que la naturaleza de los estudios era transversal y no longitudinal, como ocurría en el caso de los estudios de Hugoson (1971) y O’Neil (1979).

No queda por tanto esclarecido el papel del incremento en los niveles de hormonas sexuales femeninas en las respuestas gingivales exageradas observadas durante el embarazo.

Receptores de hormonas sexuales

La acción de las hormonas comienza con su secreción en el torrente sanguíneo, donde circulan unidas en su mayor parte a proteínas plasmáticas (98%). La fracción de hormona libre o no unida puede penetrar en las células por difusión y así ejercer su función mediante la unión a receptores intracelulares específicos que pertenecen a la superfamilia de factores de transcripción de ligandos activos que regulan el crecimiento celular, la diferenciación y el desarrollo (Mariotti 1994, Parkar et al. 1996).

Los receptores de las hormonas esteroideas se encuentran localizados en altas concentraciones en tejidos sensibles a ellas conocidos con el nombre de tejidos diana, en los que la unión entre los receptores y las hormonas determina la acumulación de estas últimas en los tejidos (Mariotti 1994).

Estudios autoradiográficos (Vittek et al. 1982a, Vittek et al. 1982b), inmunohistoquímicos (Jonson et al. 2005, Kawahara & Shimazu 2003) y de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Parkar et al. 1996) han demostrado la presencia de receptores para estrógeno en las capas basal y espinosa del epitelio gingival humano (Vitek, 1982), en fibroblastos gingivales humanos (Vittek et al. 1982), en células endoteliales y en pericitos de vasos sanguíneos pequeños de la lámina propia en biopsias gingivales humanas (Vittek al. 1982); así como receptores para progesterona en fibroblastos gingivales humanos (Kawahara & Shimazu 2003) y en biopsias gingivales de ratones (Vittek et al. 1982). Sin embargo, no se han encontrado receptores para progesterona ni para estrógeno en células pertenecientes al ligamento periodontal humano (Parkar et al. 1996, Jonson et al. 2005).

Metabolismo de las hormonas sexuales

Se ha demostrado que la encía humana es capaz de metabolizar progesterona (El-Attar et al. 1973) y estrona (Holmes & El-Attar 1977), siendo la tasa de metabolismo superior en encía inflamada que en sana (El-Attar et al. 1973, Holmes & El-Attar 1977, Ojanotko-Harri 1985).

La conversión de estrona en estradiol parece representar un proceso de bioactivación (ElAttar & Hugoson 1974), mientras que el metabolismo de la progesterona supone su inactivación (Soory 2000b). Durante el embarazo estudios *in vitro* han demostrado una baja tasa de metabolismo de progesterona en biopsias de encía con gingivitis gravídica y con granulomas gravídicos (Ojanotko-Harri 1991). De esta forma, se podría explicar la presencia de niveles elevados de progesterona y estradiol “activos” en los tejidos gingivales de mujeres embarazadas.

Los andrógenos, en especial la dihidrotestosterona (DHT), tienen un efecto anabólico en la encía (Sooyamoorthy & Gower 1989). En situaciones de salud, la testosterona es convertida en DHT gracias a la acción de la 5 α -reductasa y sus efectos anabólicos parecen estar involucrados en la reparación inflamatoria de los tejidos gingivales (Sooyamoorthy 1989, Soory 2000b). Estudios *in vitro* han demostrado que concentraciones de estradiol similares a las fisiológicas incrementan la síntesis de DHT por parte de fibroblastos gingivales humanos, mientras que concentraciones similares de progesterona tienen un efecto inhibitorio en la producción de DHT. La combinación de ambas hormonas muestra resultados intermedios dependiendo de la concentración de cada hormona. Esto parece indicar un efecto anabólico del estrógeno y uno catabólico de la progesterona (Tilakaratne & Soory 1999a,b).

Resumiendo observamos como durante el embarazo se acumulan niveles elevados de hormonas en los tejidos gingivales gracias a la presencia de receptores para las mismas y en el caso de la progesterona gracias a su baja tasa de metabolismo durante ese periodo. Estos niveles de hormonas van a ejercer sus efectos en varios aspectos de la fisiología gingival, tales como la vascularización, la dinámica celular, el biofilm bacteriano o los cambios locales en el sistema inmune. Por otro lado, como ya hemos visto, el complejo papel de la inmunología materno-fetal puede tener una repercusión especial en la predisposición de la mujer gestante frente a cualquier tipo de infección. Debido a la complejidad y al mayor interés por el mayor desarrollo de los cambios relacionados con el sistema inmune, éstos serán analizados en un apartado independiente.

3.3.1. Hormonas y cambios vasculares

Los efectos de las hormonas sexuales femeninas a nivel vascular pueden servir para explicar la clínica de edema, eritema, sangrado e incremento de fluido crevicular gingival observada durante el embarazo.

Estudios *in vitro* han demostrado que la progesterona y el estradiol son las principales responsables de la reducción de la tasa de flujo corpuscular (Lindhe y Branemark 1967a), del incremento en la permeabilidad vascular (Lindhe y Branemark 1967b) y de la proliferación vascular (Lindhe y Branemark 1967c). Sin embargo, es importante poner en perspectiva estos estudios en los que se emplean dosis de estrógenos superiores a las fisiológicas sobre tejidos no periodontales, tales como la mucosa yugal del hamster o la oreja de conejos.

En esta misma línea, varios estudios experimentales han encontrado que las hormonas sexuales femeninas inducen un incremento en el volumen de FCG en perros (El-Attar 1974) con encía clínicamente sana (Lindhe et al. 1968a) o con gingivitis (Lindhe et al. 1968b). Estudios clínicos en humanos han demostrado una correlación entre el aumento en el volumen del fluido crevicular gingival y unos niveles elevados de esteroides (Lindhe et al. 1969, Hugoson 1971). Esto parece indicar que las hormonas sexuales femeninas (progesterona y estradiol) podrían alterar la permeabilidad del surco gingival.

Por otro lado, es importante considerar que aunque a nivel general los estrógenos son las principales hormonas responsables de las alteraciones de los vasos sanguíneos en los tejidos diana de las mujeres, en el caso de la encía, parece que es la progesterona la principal responsable de los cambios vasculares (Mariotti et al. 2004, Mealey & Moritz 2003, Vittek et al. 1979).

Esto puede deberse a una acción directa de la progesterona en las células endoteliales (Mohamed et al. 1974), a posibles efectos en la síntesis de PGE2 (El-Attar 1976) y a la supresión de la respuesta celular inmune (Sooriyamoorthy & Gower 1989).

3.3.2. Hormonas y cambios celulares

Las hormonas sexuales esteroideas pueden ejercer su influencia de forma directa o indirecta en la proliferación celular, en la diferenciación y en el crecimiento de los tejidos diana. En la cavidad oral, los estudios se han enfocado sobre todo en los efectos a nivel de los queratinocitos, de los fibroblastos y de la matriz extracelular del tejido conectivo (Mariotti 1994).

Los estudios clásicos que se han centrado en los efectos de las hormonas sexuales en el epitelio gingival, encuentran que los estrógenos y las progestinas incrementan la queratinización epitelial y estimulan la proliferación celular (Mariotti 1994, Mealey & Moritz 2003, Amar & Cheng 1994). Sin embargo, estos estudios son puramente descriptivos, no poseen investigadores ciegos al tratamiento y se centran en su mayoría en los efectos clínicos e histológicos de la extirpación quirúrgica de los ovarios o de la terapia de sustitución hormonal en modelos de experimentación animal. Esto lleva a la conclusión de que parece cierto que las hormonas sexuales ejercen una acción en el epitelio gingival, pero no está muy claro cual es la respuesta de los queratinocitos a la acción hormonal.

Un estudio más reciente (Reynolds et al. 2004) realizado en babuínas embarazadas observa que la aplicación de un inhibidor del estrógeno induce un agrandamiento papilomatoso de la encía en la cara vestibular del sextante anterior. Histológicamente, observa hiperplasia del epitelio, hiperqueratosis y acantosis que se revierte tras la suplementación con estrógeno, por lo que concluye que el estrógeno posee un papel regulador en el periodonto. Sin embargo, es importante señalar que los efectos que están observando con la inhibición del estrógeno pueden ser los derivados de las elevadas concentraciones de progesterona presentes y, que sería por tanto el equilibrio entre la acción de ambas hormonas lo que tendría un efecto claro en el desarrollo de la gingivitis gravídica.

Por otro lado, nos encontramos con los estudios centrados en el tejido conectivo gingival. Éstos encuentran que, mientras la progesterona posee un efecto inhibitorio en la proliferación de fibroblastos gingivales (Willershausen et al. 1986, Christoffers et al. 2003), el estrógeno es capaz de estimularla (Mariotti 1991). Estudios más recientes

confirman que los estrógenos incrementan la proliferación de un subtipo específico de fibroblastos gingivales y reducen la producción de proteínas colágenas y no colágenas (Mariotti 2005).

También se ha demostrado que las hormonas sexuales femeninas incrementan la tasa de metabolismo del folato en la mucosa oral (Pack & Thomson 1980, Thomson & Pack 1982). Debido a que el folato es necesario para el mantenimiento de los tejidos, un metabolismo incrementado puede consumir las reservas de folato e inhibir la reparación tisular (Mealey & Moritz 2003).

Además, la progesterona en concentraciones similares a las del tercer trimestre del embarazo ha demostrado disminuir la síntesis de glucosaminoglicanos, un componente fundamental de la matriz extracelular del tejido conectivo gingival (Willershausen 1991).

Parece por tanto, que existen dos teorías complementarias sobre el papel de las hormonas en la dinámica celular que implicarían por un lado la alteración de la efectividad de la barrera epitelial frente al ataque bacteriano y por otro, la alteración del mantenimiento y reparación del colágeno. La combinación de ambas supondría una disminución en la barrera epitelial y por tanto a una mayor respuesta frente a los irritantes de la placa (Garrido de Cabo 1999, Mariotti 1994, Mealey & Moritz 2003, Sooriyamoorthy & Gower 1989).

3.3.3. Hormonas y cambios microbiológicos

Varios estudios clínicos han propuesto el incremento de *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*) durante el embarazo como factor etiológico en el desarrollo de la gingivitis gravídica.

Kornman & Loesche (1980) fueron los primeros en describir un incremento en la proporción de bacterias anaerobias/aerobias y de *P. intermedia* durante el segundo trimestre del embarazo de forma paralela al incremento en la inflamación gingival. En 1982 estos autores presentan un nuevo estudio en el que demuestran que *P. intermedia* es capaz de acumular de forma selectiva progesterona y estradiol y emplearlos como sustitutos de la vitamina K, un factor de crecimiento esencial para esa bacteria (Gibbons & MacDonald 1960). A partir de estos datos postulan que ambas hormonas actúan como factores de crecimiento para *P. intermedia* (Kornman & Loesche 1982).

Jensen et al. (1981) en un estudio transversal encuentra que *P. intermedia* incrementaba su proporción 55 veces en el grupo embarazo en comparación con el grupo control. Este incremento de *P. intermedia* era más marcado en el segundo trimestre y estaba correlacionado con el incremento en la inflamación gingival.

En un estudio sobre gingivitis experimental realizado en mujeres durante el embarazo y seis meses tras el parto, Raber-Durlacher et al. (1994) encontró nuevamente proporciones de *P. intermedia* superiores durante el embarazo, lo que coincidía con el desarrollo de mayores síntomas de inflamación gingival durante el mismo.

Sin embargo, no todos los estudios han confirmado esta hipótesis microbiológica. Así, Jonsson et al. (1988) en un estudio sobre mujeres embarazadas con periodontitis encuentran que esta patología es clínicamente semejante a la que se presenta en las mujeres no embarazadas, no evidenciando que el aumento en la concentración de hormonas en la saliva se asocie a una progresión de la enfermedad, ni a un aumento de *P. intermedia* en localizaciones con periodontitis.

Esta controversia ha llevado a pensar que el incremento de *P. intermedia* observado en el segundo trimestre del embarazo sea independiente de los niveles de

hormonas sexuales y se deba a otras causas desconocidas (Mealey & Moritz 2003, Mariotti 1994). Si nos centramos en la evidencia, parece razonable esperar que si los niveles de *P. intermedia* dependen de los niveles hormonales, entonces deberían estar más elevados en el tercer trimestre del embarazo que es cuando las hormonas sexuales alcanzan su pico máximo. Por tanto, aunque parece claro que los niveles de *P. intermedia* se elevan durante el embarazo, no está clara su influencia en la aparición de la gingivitis gravídica (Mealey & Moritz 2003).

En relación con esto, se han analizado los datos microbiológicos correspondientes a otras situaciones en las que existen alteraciones en los niveles hormonales, tales como la pubertad, el uso de anticonceptivos orales o el ciclo menstrual (Nakagawa et al. 1994, Delaney et al. 1986, van Oosten 1988, Mombelli et al. 1990, Gusberti et al. 1990, Yanover e& Ellen 1986) y se ha encontrado la misma controversia.

Sólo destacar que algunos autores también han intentado asociar otras bacterias en el desarrollo de la gingivitis gravídica, tales como *Campilobacter rectus* (Yokohama et al. 2005).

3.4. Papel del sistema inmune en la gingivitis gravídica

La razón por la cual los tejidos fetales no son rechazados por la madre es considerada como uno de los más sorprendentes enigmas de la biología. En el apartado del embarazo se han analizado los mecanismos específicos que se han propuestos a nivel sistémico para intentar explicar la compleja inmunología materno-fetal. Se concluía en ese punto que el embarazo deja a la mujer en un estado de mayor susceptibilidad o vulnerabilidad frente a agresiones externas. Por ello, se ha postulado la hipótesis de que la gingivitis gravídica puede considerarse una respuesta inflamatoria como consecuencia de un desequilibrio en la relación entre bacterias y hospedadores (Kornman & Loesche 1980, Lopatin et al. 1980, Raber-Durlacher et al. 1993).

Por otro lado, y considerando el conjunto de cambios que se producen a nivel de todo el organismo en la mujer gestante, tampoco puede excluirse que, durante el embarazo, la encía sufra cambios fisiológicos que resulten en un incremento en el enrojecimiento, en el edema y en la tendencia al sangrado, lo que dará una apariencia clínica de inflamación (Raber-Durlacher et al. 1991).

Considerando estas dos opciones, se ha propuesto que los cambios experimentados en el sistema inmune maternal durante el embarazo podrían contribuir a una mayor susceptibilidad a desarrollar inflamación gingival (Lopatin et al. 1980, O'Neil 1979a, Raber-Durlacher et al. 1991). El número de estudios que se centran en este campo es relativamente amplio, aunque su grado de evidencia científica es más bien bajo. En un intento por sistematizar su presentación, se han agrupado los **estudios experimentales** realizados en este campo en cuatro grandes grupos, correspondientes a cuatro líneas de investigación.

3.4.1. Estudios experimentales.

Primera línea de investigación: estimulación de linfocitos o monocitos tomados de sangre periférica de mujeres embarazadas con diferentes antígenos o mitógenos

O'Neil (1979) realiza un estudio con 24 mujeres embarazadas (semana 14 y 30 del embarazo y 8 semanas tras el parto) y con 26 mujeres no embarazadas (dos veces a lo largo del periodo de estudio). En cada visita toma muestras de sangre periférica que son posteriormente estimuladas con diferentes antígenos (fitohemaglutinina, proteína purificada derivada de tuberculina humana y un ultrasonido derivado de *Veillonella alcalescens*). Encuentra un incremento en el índice gingival durante el embarazo, acompañado de una reducción en la respuesta de linfocitos T maternos a la estimulación con antígenos, que se revierte tras el parto. Estos datos confirmarían la existencia de algún otro factor, además de la placa, involucrado en el incremento de la inflamación gingival.

Lopatin et al. (1980) seleccionan a 20 mujeres embarazadas (<13 semanas) y a 5 mujeres no embarazadas. En la visita inicial, a las 20-24 semanas, a las 32 semanas del embarazo, tras el parto y en cada una de las visitas de los controles (4 meses consecutivos) toman 30ml de sangre periférica, determina el índice de placa y gingival en la cara mesial del segundo premolar superior derecho y del canino inferior izquierdo y miden la cantidad de localizaciones interproximales con sangrado al sondaje. Además, determinan la blastogénesis linfocitaria inducida en sangre por antígenos (*Streptococcus sanguis*, *Actinomyces viscosus*, *Bacteroides asaccharolyticus*, *B melaninogenicus intermedius*, *B ochraceus*, *F nucleatum*) y por mitógenos (conavalina A, leucoaglutinina, pokeweed, estreptodornasa-estreptokinasa, toroide del tétanos fluido).

Encuentran una depresión en la respuesta blastogénica de los linfocitos a cinco de los seis antígenos orales probados, que coincide en el tiempo con el desarrollo de la gingivitis gravídica. Dicha inmunosupresión estaría mediada tanto por factores presentes en el suero (extrínseca) como por mecanismos celulares. Sin embargo, sería más el resultado del mecanismos inmunosupresores asociados al embarazo que enmascararían la respuesta local real.

Polan et al. (1990) aislan monocitos de sangre periférica de mujeres embarazadas en las semanas 19, 26, 30 y 36 del embarazo y de 16 mujeres sometidas a inducción de la ovulación. Encuentran una mayor secreción de IL-1 en los monocitos aislados en la fase lútea del ciclo ($52,4 \pm 17,5$ UI/ml) en comparación con la fase folicular tardía ($5,2 \pm 0,9$ UI/ml) o con el tercer trimestre del embarazo ($7,0 \pm 1,5$ UI/ml). De esta forma, concluyen que los niveles de progesterona correspondientes a la fase lútea inducen la secreción de IL-1, aunque concentraciones más elevadas, como las existentes en el tercer trimestre del embarazo, la inhiben.

Raber-Durlacher et al. (1991) seleccionan a 9 mujeres embarazadas y las inducen gingivitis experimental (14 días) en la semana 25 del embarazo y 25 semanas tras el parto. Extraen sangre venosa y determinan el número total de células CD3, CD4, CD8, CD11b y CD19 positivas. Además, aíslan los monocitos y los estimula con *Prevotella intermedia*, con fitohemaglutinina purificada, con suero linfocitario de caballo, con concavalina A y con α CD3.

Clínicamente encuentran que el índice de sangrado durante la gingivitis experimental es superior durante el embarazo que tras el parto.

En número absoluto se reduce el número de linfocitos CD3 y CD4 durante el embarazo (linfocitos T) en comparación con post-parto; sin embargo, el número de células CD4 no está disminuido en cada embarazada de forma individual. El número de células CD8 y CD11 no está alterado en el embarazo respecto a post-parto y el número de células B CD19 está disminuido.

En cuanto a la reactividad frente a diferentes antígenos no encuentran diferencias antes y después del parto.

De forma global esta línea de investigación sugiere la existencia de cierta controversia entre los autores que encuentran una respuesta de los linfocitos reducida frente a la estimulación antigénica (Lopatin et al. 1980, O'Neil 1979a, Polan et al. 1990) y los que no encuentra evidencia alguna de alteración (Raber-Durlacher et al. 1991).

<i>Segunda línea de investigación: estimulación de linfocitos tomados de sangre periférica de hombres y de mujeres no embarazadas con progesterona / estradiol</i>
--

Miyagi et al. (1993) aislan monocitos periféricos humanos de sangre venosa en 16 adultos sanos y los incuban con estradiol (0,004, 0.4, 2.0, y 20 ng/ml) y con progesterona (0.2, 2.0, 20, 200 ng/ml), previa estimulación con LPS, para determinar la concentración de PGE2 sintetizada.

Encuentran que la mera estimulación con LPS induce la producción de 2,42ng de PGE2. La adición de estradiol a 0,4ng/ml reduce la producción de PGE2 (-26,4%) y a 20ng/ml la estimula (47,1%).

Las concentraciones de progesterona de 2ng/ml y 20 ng/ml incrementan la producción de PGE2 (20.2 y 26.4%). La combinación de estradiol (0,4ng/ml) y progesterona (20ng/ml), determina una producción de PGE2 igual que el grupo control y estradiol (20ng/ml) y progesterona (20ng/ml) la incrementan hasta un 34,3%.

Los resultados sugieren que los niveles elevados de estradiol y progesterone pueden estimular la producción de PGE2 en los macrofagos de la encía y exagerar la respuesta gingival durante el embarazo.

Morishita et al. (1999), con una metodología muy similar al estudio anterior, aislan monocitos periféricos humanos de sangre venosa de 22 adultos sanos y los incubación con estradiol (0,04, 0,4, 2,0, y 20 ng/ml) y progesterona (0,002, 0,02, 0,1, 0,2, 2,0, 20, 200 ng/ml) previa estimulación con LPS, con el objetivo de evaluar la producción de IL-1 β . Encuentran que la progesterona y el estradiol suprimen de forma dosis dependiente la producción de IL-1 β por monocitos, aunque el efecto es mínimo en monocitos no estimulados con LPS. Estos resultados son similares a los publicados por **Yuan et al. (2002)** empleando la línea celular U937 tipo monocito en cultivo y granulomas inducidos en ratones en los que inyectan ambas hormonas. Obtienen que la estimulación con LPS incrementa la expresión de IL-1 β , mientras que la adición de estrógeno y/o progesterona a niveles similares a los presentes en plasma junto con LPS reduce su expresión. De nuevo, las hormonas por si solas (LPS) no son capaces de alterar la expresión de IL-1 β . Por tanto, parece que estas hormonas no alteran la capacidad de los monocitos de producir IL-1 β , si no que modifican el efecto estimulatorio del LPS en los monocitos.

<p><i>Tercera línea de investigación: estudios de biopsias con gingivitis experimental antes y después del parto</i></p>
--

Raber-Durlacher et al. (1993) inducen gingivitis experimental en nueve mujeres embarazadas durante 14 días en la semana 25 del embarazo y repiten el proceso 25 semanas tras el parto. Toman biopsias de las papilas entre los caninos y los primeros premolares superiores (13-14, 23-24) y entre ambos premolares superiores (14-15, 24-25) de forma sucesiva en cada visita (0, 4, 8 y 14 días) (13-14, 14-15, 23-24, 24-25). Las incisiones se realizan apicales al fondo del surco en vestibular y en lingual y se determina el número de células mediante la técnica de la inmunoperoxidasa. En el análisis no se incluye el infiltrado inflamatorio del tejido conectivo y se consideran dos zonas: el epitelio sulcular (epitelio sulcular oral y epitelio de unión) y el epitelio oral.

Durante el embarazo el sangrado al sondaje interproximal es superior al encontrado tras el parto. Además, durante el embarazo encuentran niveles elevados de células de Langerhans (CD1) en el epitelio oral, mientras que están disminuidas en el epitelio sulcular. En ambas zonas, el número de células CD4 está incrementado durante el embarazo, incluso el día 0 del inicio del experimento, mientras que las células B y las CD14 (macrófagos y granulocitos) están reducidas.

Los autores especulan sobre la potencial dirección del elevado número de linfocitos T presentes (CD4) hacia células Th1 con capacidad citolítica frente a células B y macrófagos, lo que les permitiría explicar el reducido número de estas células durante el embarazo. De esta forma, la citotoxicidad frente a las células de Langerhans y los macrófagos podría disminuir las fases iniciales del desarrollo de una respuesta inmune; mientras que la citotoxicidad dirigida frente a las células B podría resultar en una producción inadecuada de anticuerpos frente a bacterias asociadas con gingivitis (*P. intermedia*), lo que permitiría una manifestación clínica frente a la misma acumulación de placa más florida.

<i>Cuarta línea de investigación: Incubación de biopsias gingivales con progesterona y/o estradiol</i>
--

El-Attar 1976 incubó biopsias gingivales de 12 sujetos con encía sana y de 24 con periodontitis con estradiol (20, 30, 40µg) o con progesterona y estradiol (15, 25, 35µg) con la intención de determinar la concentración de PGE2. Encuentran que la producción de PGE2 es ocho veces superior en encía inflamada que en sana. Además, la adición de estradiol duplica la producción de PGE2 en ambos tipos de encía, y la combinación de ambas hormonas prácticamente triplica su concentración.

Este mismo autor en 1982 (**El-Attar et al. 1982**), repite un experimento similar pero con más amplio rango de concentraciones hormonales (10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-5} , 10^{-3} M). Sus resultados confirman que la combinación de progesterona y estradiol en todas sus concentraciones incrementan de forma significativa la síntesis de PGE2.

Por ello sugieren que la gingivitis gravídica puede ser debida a un incremento en la síntesis de PGE2 por parte de los tejidos gingivales como consecuencia de los niveles elevados de hormonas.

3.4.2. Estudios clínicos

De las cuatro líneas de investigación experimental anteriores se desprende que durante el embarazo existe una potencial respuesta reducida frente a los antígenos, un incremento en el número de células CD4 y una disminución de células B a nivel local. Además, los niveles elevados de hormonas que podrían encontrarse en el mismo podrían inducir un incremento en la producción de PGE2 y una reducción de IL-1β.

Sin embargo, es escaso el número de estudios que han intentado establecer cuáles son los cambios reales que se producen en el campo del sistema inmune en mujeres embarazadas. Dentro de ellos destaca el de **Kinnby et al. (1996)**, que proponen que los cambios en los niveles hormonales observados durante el embarazo podrían tener un efecto supresor en el inhibidor del activador de plasminógeno-2 (PAI-2), como observan en aquellas mujeres con un alto grado de reactividad gingival frente a la acumulación de placa.

Por otro lado, **Yuan et al. (2002)** comparan las biopsias de cinco granulomas gravídicos extirpados en el segundo trimestre del embarazo con cinco extirpados dos semanas tras el parto. Observan que la cantidad de vasos sanguíneos durante el embarazo es mayor que tras el parto, mientras que el porcentaje de células apoptóticas es superior tras el parto, lo que sugiere que la mayor parte de los vasos sanguíneos tras el parto está en fase de remisión.

Mediante técnicas de inmunohistoquímica determinan que la mayor parte de la positividad para IL-1 β y TNF- α durante el embarazo se encuentra en los macrófagos, mientras que tras el parto se encuentra en los linfocitos. El análisis mediante ELISA revela que los niveles de IL-1 β son superiores durante el embarazo que tras el parto. Esos resultados difieren de los encontrados en los estudios de experimentación en los que se sugería que los niveles de hormonas correspondientes al embarazo reducían la producción de IL-1 β (Polan et al. 1990, Morishita et al. 1999, Yuan et al. 2002).

A parte de estos dos estudios sólo se encuentra en la literatura referencias en relación a los niveles de mediadores de la inflamación en FCG en relación con la potencial asociación existente entre periodontitis y prematuros de bajo peso al nacer. Así encontramos el estudio transversal de **Offenbacher et al. (1998)**, en el que observa que los niveles de PGE2 en FCG medidos 48 horas antes o tres días después del parto son superiores en mujeres que han dado a luz a prematuros de bajo peso al nacer en comparación con partos a término y con adecuado peso. Además, encuentran una relación significativa inversa entre los niveles de PGE2 y el peso al nacimiento, por lo que proponen que los marcadores bioquímicos del estado periodontal están asociados con un riesgo incremento de prematuros de bajo peso al nacimiento.

Estudios similares son los realizados por **Hasegawa et al. (2003)** o **Konopka et al. (2003)** en los que encuentran niveles elevados de IL-1 β en suero (Hasegawa et al. 2003) y de IL-1 β y PGE2 en FCG (Konopka et al. 2003) de mujeres que han dado a luz a prematuros con bajo peso al nacer; o el de **Canakci et al. (2007)** en el que encuentran que los niveles de IL-1 β y PGE2 tanto en suero como en FCG son superiores en mujeres con pre-eclampsia que en aquellas normotensas.

Se han realizado también estudios clínicos en los que se ha intentado determinar el papel del tratamiento periodontal (raspado y alisado radicular e instrucciones de higiene oral) realizado en cada uno de los trimestres del embarazo en los niveles de PGE2 en mujeres embarazadas (**Yalcin et al. 2002a**). Se observa una reducción significativa en los niveles de PGE2 entre el segundo y el tercer trimestre del embarazo y los autores concluyen que el tratamiento periodontal puede haber sido el responsable de la reducción en los niveles de PGE2. Sin embargo, el estudio carece de un grupo control que permita llegar a esa conclusión.

Otro estudio de tratamiento de mayor calidad es el de **Offenbacher et al. (2006)**. Se trata de un estudio clínico randomizado controlado en el que comparan el raspado y alisado radicular en el segundo trimestre del embarazo con no realizar tratamiento durante el embarazo y comprueban el efecto en los niveles de IL-1 β entre otros marcadores. Encuentran que el tratamiento periodontal reduce los niveles de IL-1 β y esto lo asocian a una reducción en el riesgo de parto prematuro.

De este último grupo de estudios parece deducirse que los niveles elevados de IL-1 β y PGE2 en FCG durante el embarazo como consecuencia de una inflamación a nivel periodontal podrían tener cierto papel en la aparición de complicaciones del embarazo (pre-eclampsia, bajo peso o pretérmino), sin embargo, ninguno de ellos se ha centrado en la dirección opuesta, es decir, que quizás es el embarazo, como consecuencia de la elevación en los niveles hormonales, el responsable de los cambios en dichos mediadores.

Ya que se ha descrito que durante el embarazo se produce una exacerbación en el grado de inflamación gingival y que los estudios *in vitro* sugieren un efecto de las hormonas sexuales femeninas en la producción de IL-1 β y PGE2, resultaría interesante realizar un estudio que comprobara si la alteración en los niveles hormonales asociados al mismo puede tener alguna implicación en el nivel de los mediadores de la inflamación más estudiados (IL-1 β y PGE2).

Capítulo II.

**JUSTIFICACIÓN,
HIPÓTESIS Y
OBJETIVOS**

JUSTIFICACIÓN

Los estudios *in vitro* sugieren que la elevación de los niveles de hormonas sexuales femeninas (progesterona y estradiol) alteran la producción de IL-1 β y PGE2 de forma sistémica y local, y postulan que estos cambios pueden ser los responsables del incremento en la inflamación gingival asociada al embarazo. Sin embargo, no existe ningún estudio clínico que haya enfocado este aspecto de forma prioritaria, tratanto de establecer *in vivo* si se pueden confirmar los cambios sugeridos para estos mediadores.

HIPÓTESIS

La inflamación gingival exagerada asociada al embarazo puede estar relacionada con el incremento en los niveles hormonales característicos del mismo y con el cambio consiguiente en los niveles de IL-1 β y PGE2 en el fluido crevicular gingival.

OBJETIVOS

1. Evaluar de forma prospectiva los cambios gingivales que tienen lugar en un grupo de mujeres embarazadas, desde un punto de vista clínico, inmunológico y hormonal.
2. Correlacionar el cambio en la inflamación gingival con las alteraciones en los niveles de hormonas en saliva y los niveles de IL-1 β y PGE2 en FCG.
3. Comparar los cambios gingivales que se producen en las mujeres embarazadas a lo largo de seis meses de embarazo, con aquellos que pudieran tener lugar en un grupo de mujeres no embarazadas durante el mismo periodo de tiempo.

Capítulo III.

**PACIENTES Y
MÉTODO**

1. PACIENTES

El protocolo del presente estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Clínico Universitario San Carlos (Madrid).

1.1. Población.

Las mujeres fueron reclutadas de forma consecutiva del Servicio de Obstetricia del Ambulatorio José Marvá (Área V del INSALUD de Madrid) (grupo embarazo) y del Servicio de Recepción de Pacientes de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid (grupo no embarazo).

Criterios de inclusión:

1. Mujeres con edades comprendidas entre los 20 y 35 años.
2. Presencia de al menos 20 dientes naturales, excluyendo los terceros molares.
3. Otorgar consentimiento informado por escrito y comprometerse a acudir a las citas establecidas.

Criterios de exclusión:

1. Fumadoras.
2. Diagnóstico de periodontitis crónica o agresiva (Armitage, 1999).
3. Presencia de patología aguda periodontal o dental.
4. Presencia de enfermedades sistémicas o medicación que se considere pueda producir alteraciones a nivel periodontal.
5. Haber recibido tratamiento antibiótico o profilaxis dental en los 6 meses previos.

Además de cumplir con los criterios de inclusión/exclusión previamente descritos, las mujeres embarazadas fueron incluidas si se encontraban entre las semanas 12 a 14 de gestación en la primera visita del estudio. Por su parte, las mujeres no embarazadas fueron excluidas en el caso de estar tomando anticonceptivos orales, de estar embarazadas o con la intención de estarlo en los seis meses siguientes.

1.2. Selección de los sujetos.

1.2.1. Mujeres embarazadas.

Mediante una revisión exhaustiva de las historias clínicas consecutivas del Servicio de Obstetricia del Ambulatorio José Marvá (Área V del IMSALUD) se obtuvieron los teléfonos de aquellas mujeres que se encontraban entre la semana 12-14 de gestación y que según la historia médica cumplían los criterios de inclusión (ausencia de enfermedades sistémicas y de medicación con potencial implicación a nivel periodontal).

Se concertó una cita en el Servicio de Odontología de dicho ambulatorio en la que se realizó una exploración periodontal completa que incluía la evaluación de la profundidad de sondaje, el nivel de inserción clínico y el sangrado al sondaje en seis localizaciones por diente en todos los dientes salvo los terceros molares. Tras haber establecido el diagnóstico periodontal de cada paciente, todas aquellas mujeres que cumplían los criterios de inclusión / exclusión establecidos fueron invitadas a participar en el estudio.

1.2.2. Mujeres no embarazadas

Se obtuvieron las hojas de citaciones del Servicio de Recepción de Pacientes de la facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) de las semanas precedentes al estudio y tras establecer contacto telefónico con las posibles candidatas, éstas fueron citadas en las clínicas del Master de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la UCM para establecer su diagnóstico periodontal de forma similar a la descrita para el grupo embarazo. En el caso de cumplir con los criterios de inclusión/exclusión fueron invitadas a participar en el estudio.

1.3. Potencia del estudio.

El cálculo del tamaño muestral se realizó con el programa Sample Power 2.0. El estudio se diseñó para tener suficiente potencia como para detectar una diferencia real de 0,15 puntos en el valor del índice gingival entre cualquiera de los periodos del embarazo (Cohen 1969, Tilakaratne et al. 2000) con un riesgo α de 0,05 y un poder del 80%.

2. MÉTODO.

2.1. Diseño del estudio.

Se realizó un estudio clínico longitudinal, controlado y observacional de nueve meses de duración.

Tras su inclusión en el estudio las mujeres embarazadas recibieron un total de cuatro visitas, una en cada uno de los trimestres del embarazo y la última, tres meses tras el parto. La cronología fue la siguiente:

- Selección de pacientes.
- Visita 1: 12-14 semanas de gestación (3º mes de embarazo).
- Visita 2: 23-25 semanas de gestación (6º mes de embarazo).
- Visita 3: 33-36 semanas de gestación (8º mes de embarazo).
- Visita 4: 3 meses posparto.

En el caso de las mujeres no embarazadas se realizaron dos visitas coincidiendo con las visitas 1 y 3 de las mujeres embarazadas. En dichas visitas, las mujeres debían encontrarse en la fase de cuerpo lúteo o secretora del ciclo genital femenino (día 17-21), con el fin de que en todas ellas existieran niveles hormonales parecidos (Zaki et al. 1984, Machtei et al. 2004)

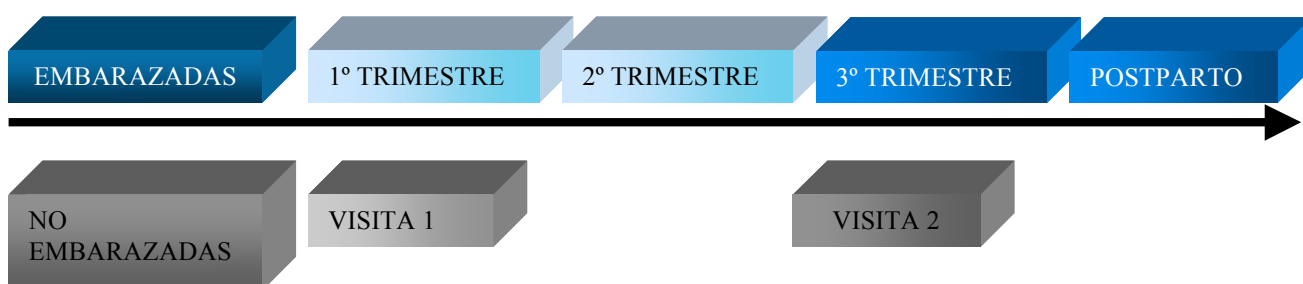


Figura 18: Esquema general del estudio

En cada una de las visitas se registraron parámetros clínicos, se recogieron muestras de saliva y de fluido crevicular gingival (FCG) y se entregó un cepillo dental (Vitis access®, Dentaïd, Sant Cugat del Vallés, España) y un dentífrico (Colgate Total®, Colgate, Piscataway, NJ, Estados Unidos).

Al inicio del estudio cada mujer recibe instrucciones de higiene oral básicas, sin hacer especial énfasis en la higiene interproximal y al finalizar todas recibieron una profilaxis dental.

2.2. Consentimiento informado.

Las pacientes recibieron información detallada sobre las características y objetivos que se pretendían alcanzar con el estudio y todas ellas accedieron voluntariamente a participar en el mismo. Por ello se les entregó un consentimiento informado (Anexo I) que firmaron antes de comenzar el estudio.

2.3. Cuestionario.

Antes de iniciar las exploraciones, las pacientes rellenaron una encuesta con la intención de obtener información sobre su trasfondo socio-cultural (edad, nivel de estudios, profesión), así como sobre su última visita al dentista y su frecuencia de cepillado dental (Machuca et al. 1999; Yalcin et al. 2002) (Anexo II).

2.4. Recogida de parámetros clínicos.

La toma de datos clínicos se realizó después de la toma de muestras para evitar la potencial contaminación con sangre de las muestras de FCG y de saliva. En ella se incluyó el registro del índice de placa (IP) (Silness y Løe, 1964) y el índice gingival (IG) (Løe y Silness, 1963) en todos los dientes (excepto los terceros molares), en cuatro localizaciones por diente (mesial, distal, vestibular y lingual), con una sonda periodontal CPC-12 (Hu-Friedy, Leimen, Alemania).

2.4.1. Índice de placa (Silness y Løe, 1964).

Mide el grosor de la placa supragingival a través de una escala que va de 0 a 3, sin necesidad de tinción:

0. Ausencia de placa.
1. Placa no visible, pero que puede extraerse del tercio cervical del diente con ayuda de una sonda.
2. Acumulación moderada de placa en el área gingival que es apreciable a simple vista.
3. Placa abundante en la zona, cubriendo incluso al diente adyacente.

El índice se calcula sumando todas las puntuaciones y dividiendo entre el número de superficies analizadas.

2.4.2. Índice gingival (Löe y Silness, 1963).

Mide la salud de las encías en las mismas superficies y dientes y en la misma escala que el índice de placa. Los valores son:

0. Encía sana.
1. Ligera inflamación, discreto edema y cambio en el color. No hemorragia al sondaje.
2. Inflamación moderada, enrojecimiento, edema. Hemorragia al sondaje.
3. Inflamación severa, marcado enrojecimiento, edema y ulceración. Hemorragia espontánea.

El índice se obtiene sumando todas las puntuaciones y dividiendo entre el número de superficies observadas. Los datos obtenidos permiten clasificar a los pacientes en función de su grado de gingivitis:

- a. Gingivitis leve: 0,1-1.
- b. Gingivitis moderada: 1,1-2.
- c. Gingivitis severa: >2.

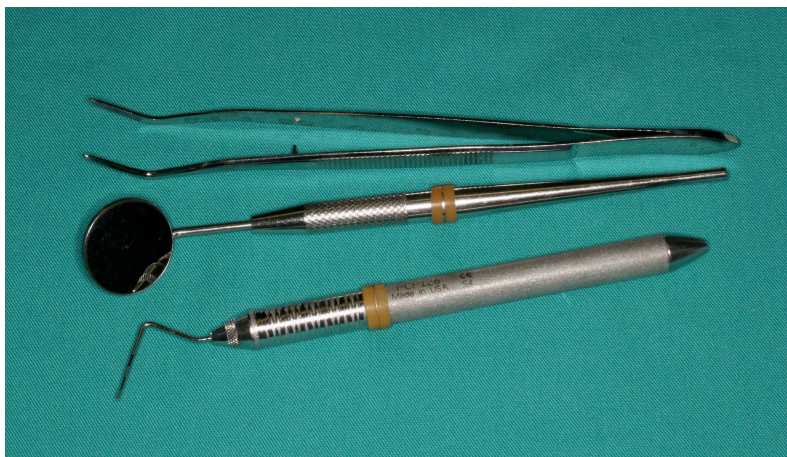


Figura 19: Instrumental empleado para la exploración clínica.

2.5. Toma de muestras.

2.5.1. Recogida de saliva.

Las muestras de saliva fueron tomadas en primer lugar para evitar su potencial contaminación con sangre.

Se realizó en el sillón dental con el respaldo vertical y la cabeza ligeramente inclinada hacia delante (Grau et al. 2002). Tras un enjuague con agua (Tallon et al. 1984, Gann et al. 2001), se pidió a las pacientes que cerraran la boca y que al minuto tragarán saliva (periodo de equilibrio). Tras ello, volvían a cerrar la boca y mantenían en su interior la saliva producida, dejándola después fluir sobre un tubo de cristal estéril por un total de dos minutos (Grau et al. 2002). De esta forma se recogió la saliva total no estimulada de cada paciente (Zaki et al. 1984).

Las muestras fueron tomadas siempre por la mañana para evitar las variaciones hormonales asociadas al ritmo circadiano de fluctuación de los esteroides (Morishita et al. 1988).

Las muestras fueron congeladas a una temperatura de -20°C y almacenadas hasta su posterior análisis (Gann et al. 2001, Meulenberg & Hofman 1989, Morishita et al. 1988, Tallon et al. 1984).



Figura 20: Tubo de cristal estéril empleado para la recogida de las muestras de saliva.

2.5.2. Muestras de fluido crevicular gingival (FCG)

2.5.2.1 Toma de muestras de FCG

Las muestras de fluido crevicular gingival (FCG) se tomaron del surco gingival mesio-vestibular de ambos caninos superiores (13 y 23) mediante tiras de papel absorbente (Periopaper® Harco, Irvine, CA). La selección de las localizaciones se realizó en base a los resultados obtenidos en estudios clínicos previos que habían encontrado que durante el embarazo el mayor incremento en el grado de inflamación gingival se producía en los dientes anteriores (Löe 1965, Silness & Löe 1964).

Para tomar las muestras se aisló la zona con rollos de algodón y se eliminó la placa supragingival presente mediante una cureta, teniendo especial cuidado en no tocar el margen gingival. La zona se secó mediante un suave chorro de aire continuo durante 5-10 segundos (Griffiths et al. 1992, Stoller et al. 1990, D'Aoust & Landry 1994). A continuación se introdujo la tira de papel en el fondo del surco hasta sentir una suave resistencia y se mantuvo en posición durante 30 segundos (Alpagot et al. 2007, Nelson et al. 1992, Rawlinson et al. 2000, Weiger et al. 1989, Yucel et al. 2008).

Las tiras de papel contaminadas con sangre se desecharon y se tomó una nueva muestra de FCG del surco mesivestibular del premolar adyacente (14 o 24). Si esta nueva muestra resultaba de nuevo contaminada, se desechaba y se consideraba ese dato como ausente.



Figura 22: Tira de papel colocada en el surco gingival.



Figura 21: Tira de papel Periopaper (R).

2.5.2.2. Cálculo del volumen de FCG.

A continuación se cuantificó el volumen de FCG obtenido mediante el Periotron 8000 ® (Harco, Irvine, CA); para ello se extrapoló la lectura digital dada por el mismo con una curva de calibrado con suero fisiológico del aparato realizada previamente (Chapple et al. 1995, Chapple et al. 1999, Ciantar & Caruana 1998). Los sensores del aparato se limpiaban con etanol entre cada lectura.

Inmediatamente después se guardó cada tira en un tubo *Eppendorf Micro-Spin* con filtro (Lida Manufacturing Corp, N, EEUU) a -80°C hasta su posterior análisis.



Figura 24: Periotron 8000 ®.

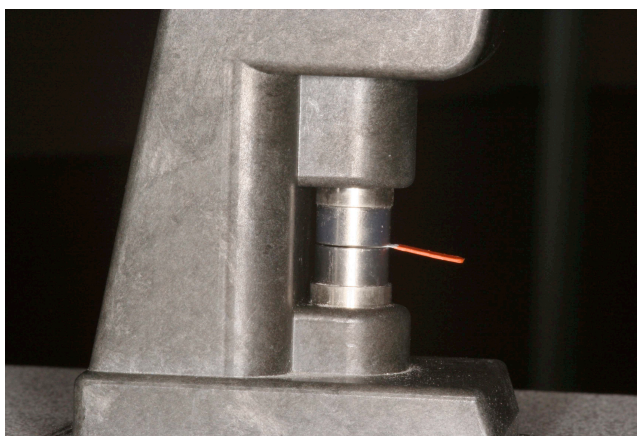


Figura 23: Detalle con tira de papel colocada entre las valvas del Periotron 8000 ®.

2.6. Análisis de las muestras

Todas las muestras fueron analizadas en el laboratorio de investigación de la Facultad de Odontología de la UCM.

2.6.1. Análisis de hormonas en saliva.

2.6.1.1.Preparación de las muestras

Las muestras fueron descongeladas y centrifugadas a temperatura ambiente a 3000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante fue recolectado y empleado para determinar la concentración de progesterona y estradiol en saliva (Chatterton et al. 2005, Gann et al. 2001, Lequin et al. 1986, Lipson & Ellison 1996, Meulenberg & Hofman 1989).

Ambas hormonas fueron analizadas mediante kits de determinación directa inmunoenzimática (ELISA: *Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay*) (DIA.METRA S.r.l, Foligno, Italia) (Gándara et al. 2007, Tallon et al. 1984) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.6.1.2. Progesterona.

Principio de la técnica

El principio de esta técnica se basa en la competición de la progesterona presente en las muestras (antígeno) con el antígeno marcado con peroxidasa de rábano por la unión a un número limitado de anticuerpos anti-progesterona previamente depositados en los pocillos facilitados por la casa comercial (fase sólida). Tras su incubación y lavado queda separada la porción de progesterona libre de la unida y se añade el sustrato del enzima (H_2O_2) y el sustrato TMB. Después de un periodo de tiempo adecuado para que se produzca el mayor desarrollo de color, se para la reacción enzimática y se determina la absorbancia. La concentración de hormona de la muestra se calcula en base a una serie de estándares, siendo la intensidad del color inversamente proporcional a la concentración de progesterona de la muestra.

Instrumentación, material y reactivos

Reactivos y materiales proporcionados por en el kit:

- Solución estándar de progesterona a diferentes concentraciones (S0 a S4) (1 ml)
- Una botella de solución buffer de incubación (30 ml de buffer de fosfato).
- Una botella de conjugado (progesterona conjugada con peroxidasa de rábano (0,4 ml).
- Pocillos recubiertos de anticuerpo antiprogesterona tipo inmunoglobulina G.
- Una botella de sustrato TMB y H₂O₂ (12 ml).
- Una botella de solución stop (ácido sulfúrico 0,15 mol/l) (12 ml).

Todos los reactivos deben almacenarse entre 2° y 8°C en ausencia de luz. La bolsa de los pocillos sólo debe ser abierta cuando se encuentre a temperatura ambiente y debe ser cerrada inmediatamente después de su uso.

Preparación de los reactivos:

a) Soluciones estándar:

La curva estándar se elaboró con cinco soluciones con concentraciones de progesterona previamente conocidas:

	S0	S1	S2	S3	S4
pg/ml	0	10	100	500	3000

b) Conjugado diluido.

Se preparó inmediatamente antes de ser usado añadiendo 10 µl de conjugado de progesterona a 1 ml de buffer de incubación.

Procedimiento

Se emplearon dos pocillos para cada uno de los puntos de la curva estándar (S0-S4), dos para el blanco y uno para cada muestra.

En primer lugar se pipetearon las siguientes cantidades de las soluciones estándar, de muestra y de conjugado, que fueron depositados en los pocillos:

	Estándar	Muestra	Blanco
Muestra	-----	50 µl	-----
Estándar S0 a S4	50µl	-----	-----
Conjugado	200µl	200µl	-----

Todo ello se incubó a temperatura ambiente (20-25°C) durante una hora, tras la cual, se eliminó el sobrante de cada pocillo y se lavó con 300 µl de agua destilada (lavador automático).

Posteriormente se añadió en cada pocillo el cromógeno (sustrato TMB) según las siguientes indicaciones:

	<i>Estándar</i>	<i>Muestra</i>	<i>Blanco</i>
Sustrato TMB	100 µl	100µl	100µl

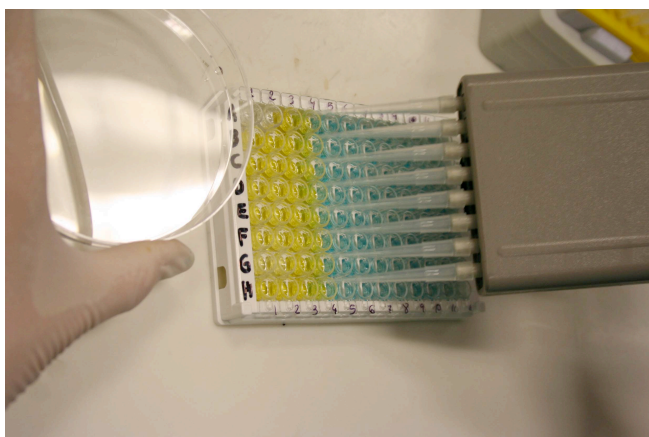


Figura 25: Imagen añadiendo TMB en cada uno de los pocillos.

Se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos en oscuridad, tras los cuales se añadieron 100 µl de solución stop (ácido sulfúrico 0,15 mol/l) en todos los pocillos.

En este momento se llevaron los pocillos al lector de ELISA para leer la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm contra el blanco.



Figura 26: Lector para kits de ELISA

Cálculo de los resultados

Los valores de concentración de progesterona de cada muestra se obtuvieron aplicando un paquete estadístico con un programa para ajuste logístico de curvas de cuatro parámetros.

Especificidad del kit:

La reacción cruzada calculada al 50% es:

- | | |
|-------------------------------------|---|
| - Progesterona: 100%. | - Estradiol: $<1 \times 10^{-2}\%$. |
| - 11 α OH progesterona: 18%. | - Testosterona: $<1 \times 10^{-2}\%$. |
| - 17 α OH progesterona: 16%. | - Cortisol: $<1 \times 10^{-2}\%$. |
| - 20 α OH progesterona: 1%. | - Colesterol: $<1 \times 10^{-3}\%$. |

Precisión del kit: La precisión intra e inter-análisis presenta un coeficiente de variación de 2,9% y 4,8%, respectivamente.

2.6.1.3. 17 β -Estradiol.

El principio de la técnica aplicada para calcular las concentraciones de estradiol en las muestras es el mismo que el de la progesterona. Este método permite determinar concentraciones de 17 β -estradiol que varían desde 0 pg/ml a 100 pg/ml.

En este caso las soluciones estándares presentan las siguientes concentraciones:

	S0	S1	S2	S3	S4
pg/ml	0	1	5	20	100

La preparación de los reactivos así como el procedimiento a seguir fue el mismo que el de la progesterona, excepto por las siguientes diferencias:

- Se pipetearon 100 μ l de estándar, 100 μ l de muestra y 100 μ l de conjugado.

	Estándar	Muestra	Blanco
Muestra	-----	100 μ l	-----
Estándar S0 a S4	100 μ l	-----	-----
Conjugado	100 μ l	100 μ l	-----

- La primera incubación se realizó a +37°C durante 2 horas (en lugar de 1).
- La segunda incubación se hizo a temperatura ambiente (20-25°C) durante 30 minutos (en lugar de 15) en la oscuridad.

Especificidad del kit

La reacción cruzada calculada al 50% es:

- 17 β estradiol: 100%.
- Estrona: 2,0%.
- Estriol: 0,39%.
- Testosterona: 0,02%.
- Cortisol: 7x10⁻³%.
- Progesterona: 3x10⁻⁴%.
- Dehidroepiandrosterona: 1x10⁻⁴%.

Precisión del kit: La precisión intra e inter-análisis presenta un coeficiente de variación de 3,4% y 5,9%, respectivamente.

2.6.2. Análisis de las muestras de fluido crevicular gingival.

2.6.2.1. Calibrado del Periotron 8000®.

Se construyó una gráfica de calibrado para el Periotron 8000 ® de tal modo que permitiera transformar las unidades digitales dadas por el aparato en unidades de volumen (µl).

En tiras de papel (Periopaper®) y con la ayuda de una jeringa Hamilton, se depositaron volúmenes conocidos de suero fisiológico (0,1 a 1,2 µl), con incrementos de 0,1µl. Por cada volumen se realizaron tres medidas.

Con los datos obtenidos se realiza un estudio de regresión siguiendo una ecuación polinómica de cuarto orden (Chapple et al. 1995, Chapple et al. 1999, Ciantar & Caruana 1998).

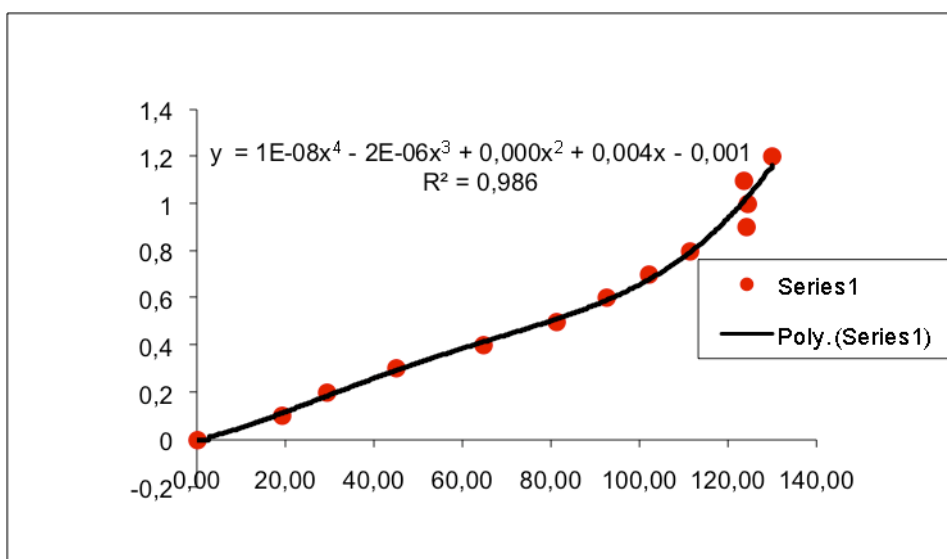


Figura 27: Curva de calibración del Periotron 8000® según un polinomio de cuarto grado.

2.6.2.2. Elución de las muestras de FCG de las tiras de papel

En primer lugar, las muestras de FCG fueron descongeladas hasta alcanzar temperatura ambiente.

Para realizar la elución se elaboró una solución tampón (50mM de fosfato tampón, pH:7,2) con inhibidores de proteasas (0,1mM metilfenilsulfonil fluoruro, 50mg/ml de leupeptina, pepstatina y antipaina) (Uematsu et al. 1996).

Se añadieron 200µl de la solución de elución en cada tubo *Eppendorf* y se mantuvieron 20 minutos a 4° C. A continuación se centrifugó a 150.000 rpm durante 5 minutos. La tira de papel se desechó y los sobrenadantes correspondientes a cada muestra se recolectaron en nuevos tubo *Eppendorf* para proceder a su análisis.

Las muestras tomadas del canino superior derecho (13) fueron empleadas para determinar la concentración de IL-1 β , mientras que las tomadas en el canino superior izquierdo (23) se emplearon para las determinaciones de PGE2.



Figura 28: Colocación de tubos Eppendorf en la centrifuga.

2.6.3. INTERLEUQUINA 1 β (IL-1 β)

Los niveles de IL-1 β fueron cuatificados mediante un kit de determinación inmunoenzimática ELISA, siguiendo las indicaciones del fabricante (BLK Diagnostic International, Badalona, Barcelona, España).

Principios de la técnica

Un anticuerpo específico frente a la IL-1 β se adhiere en los pocillos, de tal modo, que la IL-1 β presente en la muestra o en las soluciones estándar se une a los anticuerpos de la base de los pocillos. Tras ellos, se añade un segundo anticuerpo frente a IL-1 β conjugado con biotina. De este modo, durante el proceso de incubación, la IL-1 β se unirá simultáneamente al anticuerpo inmovilizado en la base de los pocillos por un lado, y a la fase acuosa del anticuerpo conjugado con biotina por otra.

El exceso de conjugado de biotina no unida se retira mediante lavado y se añade la estreptavidina-peroxidasa (estreptavidina-HRP) que se une al anticuerpo conjugado con biotina, para completar el sándwich de cuatro elementos. Tras un periodo de incubación, se retira la estreptavidina-HRP no unida mediante lavado y se añade la solución sustrato reactiva con HRP. Se forma un producto coloreado en función de la cantidad de IL-1 β presente en la muestra (directamente proporcional). La reacción finaliza mediante la adición de ácido y la absorbancia se mide a 450nm. Se prepara una curva estándar a partir de las diluciones de IL-1 β conocidas y a partir de ella se determina la concentración de IL-1 β de las muestras.

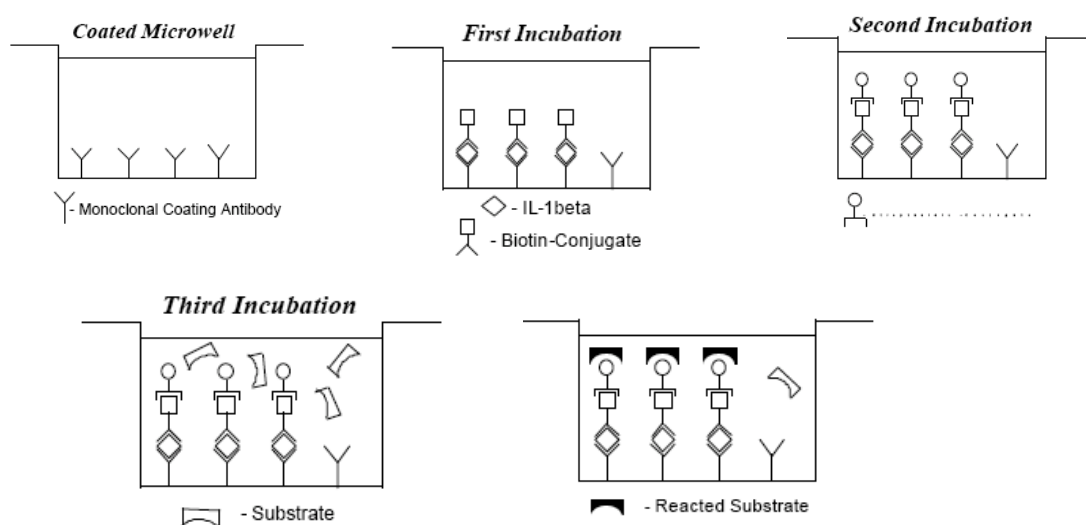


Figura 29: Esquema de funcionamiento del kit de ELISA.

Instrumental, material y reactivos

Reactivos y materiales proporcionados por el kit:

- Plato con 96 pocillos recubiertos de anticuerpo frente a IL-1 β .
- Solución de anticuerpo anti-IL-1 β conjugado con biotina (100 μ l).
- Solución de Estreptavidina-Peroxidasa (HRP) concentrada (150 μ l).
- Solución estándar de IL-1 β a una concentración de 500pg/ml.
- Solución de lavado concentrada (20x) (50ml): PBS con 1% de Tween 20.
- Solución buffer diluyente (12ml).
- Solución buffer concentrada (20x) (PBS con 1% de Tween 20 y 10% BSA) (5ml).
- Solución stop.
- Solución sustrato I: tetrametilbenzidina (7 ml).
- Solución sustrato II: 0,02% de peróxido de hidrógeno tamponado (7ml).
- Hojas adhesivas para recubrir plato con pocillos.



Figura 30: Componentes del Kit de ELISA para IL-1 β .

Otros materiales no suministrados por el kit

- Agua desionizada o destilada.
- Pipetas de precisión.
- Recipientes desechables para realizar las diluciones
- Espectrofotómetro.
- Lavador automático

Preparación de los reactivos:

a) Solución de lavado

Se preparó mezclando los 50ml del concentrado suministrado en 950 ml de agua desionizada. El pH se ajustó a 7,4.

b) Solución Buffer.

Se mezclaron los 5 ml de la solución buffer concentrada con 95 ml de agua destilada o desionizada.

c) Conjugado de biotina.

Se realizó una dilución 1:10 empleando la solución buffer.

d) Soluciones estándar de IL-1 β .

El estándar liofilizado se reconstituyó con agua destilada. La curva estándar se elaboró con siete soluciones con concentraciones de IL-1 β previamente conocidas y preparadas a partir de la solución estándar de IL-1 β diluida con solución buffer diluyente

	<i>S0</i>	<i>S1</i>	<i>S2</i>	<i>S3</i>	<i>S4</i>	<i>S5</i>	<i>S6</i>	<i>S7</i>
pg/ml	0	3,9	7,8	15,6	31,3	62,5	125	250

e) Solución de Estreptavidina-HRP.

Se realizó una dilución 1:200 de la solución concentrada de estreptavidina-HRP.

f) Solución del sustrato TMB.

Se dispensaron volúmenes iguales de la solución sustrato I y II y se agitaron suavemente hasta que se obtuvo un color amarillo. En este paso es importante emplear pipetas y recipientes libres de metal para evitar la contaminación de la solución final. Esta solución debe prepararse unos minutos antes de que vaya a emplearse.

Procedimiento

Se emplearon dos pocillos para cada uno de los puntos de la curva estándar (S0-S7), dos para el blanco y uno para cada muestra.

En primer lugar se lavaron por duplicado los pocillos en el lavador automático con 300µl de solución de lavado. El exceso de líquido se retiró con papel absorbente.

A continuación, se pipetearon las siguientes cantidades de las soluciones estándar, de muestra, de diluyente y de conjugado:

	Estándar	Muestra	Blanco
Muestra	-----	50 µl	-----
Estándar S0 a S7	50µl	-----	-----
Diluyente	50µl	50µl	100µl
Conjugado	50µl	50µl	-----

Todo ello se incubó a temperatura ambiente (18-25°C) en un agitador (100rpm) durante dos horas.

Se eliminó el sobrante de cada pocillo y se lavó tres veces con 300 µl de agua destilada (lavador automático), secando el líquido final remanente con papel absorbente.

Posteriormente se añadió en cada pocillo la solución de estreptavidina-HRP según las siguientes indicaciones:

	<i>Estándar</i>	<i>Muestra</i>	<i>Blanco</i>
Estreptavidina-HRP	100 µl	100µl	100µl

Se incubó a temperatura ambiente durante una hora, en un agitador a 100rpm, tras los cuales se lavó 3 veces con 300µl de agua destilada (lavador automático), secando el líquido final remanente con papel absorbente.

Posteriormente se añadió en cada pocillo la solución sustrato TMB según las siguientes indicaciones:

	<i>Estándar</i>	<i>Muestra</i>	<i>Blanco</i>
Sustrato TMB	100 µl	100µl	100µl

Se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, en un agitador a 100rpm, evitando la exposición a luz intensa.

En este momento, se frenó la reacción enzimática añadiendo 100µl de solución stop a cada pocillo y se llevó el plato al lector de kits ELISA para leer la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm contra el blanco.

Cálculo de los resultados

Los valores de concentración de IL-1 β de cada muestra se obtienen aplicando un paquete estadístico con un programa para ajuste logístico de curvas de cuatro parámetros.

Sensibilidad del test: El límite de detección de IL-1 β definida como la concentración resultante con una absorción significativamente mayor que la del medio de dilución es de 2pg/ml.

Reproducibilidad intra-ensayo: 5,1%. Evaluada en tres experimentos independientes, cada uno con seis réplicas de seis muestras de suero conteniendo concentraciones diferentes de IL-1 β .

Reproducibilidad inter-ensayo: 5,6%. Evaluada en tres experimentos realizados por dos técnicos. En cada experimento se evaluaban 6 réplicas de 8 muestras con diferentes concentraciones de IL-1 β .

2.6.4. PROSTAGLANDINA E₂ (PGE₂)

La PGE₂ es analizada mediante un kit de determinación inmunoenzimática ELISA, siguiendo las indicaciones del fabricante (DRG Diagnostic, DRG Instruments GmbH, Marburg; Alemania).

Principio de la técnica

Este test emplea un anticuerpo monoclonal anti-PGE₂ que se une de forma competitiva con la PGE₂ presente en la muestra. Tras un periodo de incubación, los reactivos que se encuentran en exceso son retirados y se añade el sustrato. Tras frenar la reacción con una solución stop, la intensidad de color generada es leída en un lector a 405nm. Al igual que ocurría con la progesterona y el estradiol, en este caso, la intensidad de color generado es inversamente proporcional a la concentración de PGE₂ presente en los pocillos.

Instrumental, material y reactivos

Reactivos y materiales proporcionados por el kit:

- Plato con 96 pocillos recubiertos de anticuerpo de cabra específicos para IgG de ratón.
- Conjugado (6ml): solución azul de fosfatasa alcalina conjugada con PGE₂.
- Anticuerpo (6ml): solución amarilla de anticuerpo monoclonal frente a PGE₂.
- Solución buffer (30 ml): solución salina con tris-buffer con proteínas y un sodio azide.
- Solución de lavado concentrada (30 ml): solución salina con tris-buffer y detergentes.
- Solución estándar de PGE₂ con una concentración de 50.000pg/ml (0,5ml).
- Sustrato p-Npp (20 ml): solución buffer de fosfato de p-nitrofenil.
- Solución stop (5 ml): solución de fosfato trisódico en agua.

Otros materiales no suministrados por el kit

- Agua desionizada o destilada.
- Pipetas de precisión.
- Recipientes desechables para realizar las diluciones
- Agitador para los pocillos.

- Papel absorbente.
- Espectrofotómetro.



Figura 31: Kit de ELISA para PGE2.

Preparación de los reactivos:

a) Soluciones estándar:

La curva estándar se elaboró con siete soluciones con concentraciones de PGE2 previamente conocidas:

	<i>S0</i>	<i>S1</i>	<i>S2</i>	<i>S3</i>	<i>S4</i>	<i>S5</i>	<i>S6</i>	<i>S7</i>
pg/ml	0	39,1	78,1	156	313	625	1.250	2.500

b) Conjugado de PGE2

Se descongeló hasta alcanzar temperatura ambiente, puesto que es el único componente del kit que necesita ser mantenido a -20°C para su conservación.

c) Solución de lavado

Se preparó diluyendo 5 ml del concentrado suministrado en 95 ml de agua desionizada.

Procedimiento

Se emplearon dos pocillos para cada uno de los puntos de la curva estándar (S0-S7), dos para el blanco y uno para cada muestra.

En primer lugar se pipetearon las siguientes cantidades de las soluciones estándar, de muestra, de conjugado y de anticuerpo, que fueron depositados en los pocillos:

	Estándar	Muestra	Blanco
Muestra	-----	100 µl	-----
Estándar S0 a S7	100µl	-----	-----
Conjugado	50µl	50µl	-----
Anticuerpo	50µl	50µl	-----

Todo ello se incubó a temperatura ambiente (20-25°C) en un agitador durante dos horas a 500 rpm.

Se eliminó el sobrante de cada pocillo y se lavó con 400 µl de agua destilada (lavador automático), realizando un total de tres lavados y secando el líquido final remanente con papel absorbente.

Posteriormente se añadió en cada pocillo el sustrato p-Npp según las siguientes indicaciones:

	Estándar	Muestra	Blanco
Sustrato p-Npp	200 µl	200µl	200µl

Se incubó a temperatura ambiente durante 45 minutos sin agitar, tras los cuales se añadiero 50 µl de solución stop en todos los pocillos.

En este momento se llevó el plato al espectrofotómetro para leer la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm contra el blanco, con una corrección entre 570 y 590 nm.

Cálculo de los resultados

Los valores de concentración de PGE₂ de cada muestra se obtienen aplicando un paquete estadístico con un programa para ajuste logístico de curvas de cuatro parámetros.

Reacciones cruzadas del kit

- PGE₂: 100%.
- PGE₁: 70%.
- PGE₃: 16,3%.
- PGF_{1α}: 1,4%.
- PGF_{2α}: 0,7%.
- 6-keto-PGF_{1α}: 0,6%.
- PGA₂: 0,1%.
- PGB₁: 0,1%.
- 13, 14-dihidro-15-keto-PGF_{2α}: <0,1%.
- 6,15-keto-13,14-dihidro-PGF_{1α}: <0,1%.
- Tromboxano B₂: <0,1%.
- 2-araquidonilglicerol: <0,1%.
- Anandamide: < 0,1%.
- PGD₂: <0,1%.
- Ácido araquidónico: <0,1%.

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos ha sido realizado en el Centro de Cálculo de la Universidad Complutense de Madrid mediante el programa SPSS version 16.0.

3.1. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

Se realiza estadística descriptiva de todas las variables analizadas en cada una de las visitas y para ambos grupos de estudio:

- **Variables socio-demográficas:**
 - Edad.
 - Nivel de estudios: ninguno, primaria, secundaria, universidad.
 - Profesión: empleadas, profesiones liberales, amas de casa, estudiantes.
- **Variables relacionadas con los antecedentes odontológicos:**
 - Frecuencia de cepillado dental: 3 veces/día, 2 veces/día, 1 vez/día, ocasionalmente.
 - Tiempo transcurrido desde la última visita al odontólogo: mayor o menor a un año.
 - Percepción del estado de salud bucal: bueno, malo, regular.
- **Variables clínicas:**
 - Índice de placa e índice gingival:
 - De toda la boca.
 - Del sector anterior (incisivos y caninos).
 - Del sector posterior (premolares y molares).
 - De localizaciones interproximales (mesiales y distales).
 - De caras libres (vestibulares y linguales).
 - Porcentaje de localizaciones con placa. El índice de placa de Silness y Løe (1964) fue dicotomizado determinando la suma del porcentaje de localizaciones con índice de placa 1, 2 y 3.
 - Porcentaje de localizaciones con sangrado. El índice gingival de Løe y Silness (1963) fue dicotomizado determinando la suma del porcentaje de localizaciones con índice gingival 2 y 3.

- Porcentaje de localizaciones con inflamación. El índice gingival de Løe y Silness (1963) fue dicotomizado determinando la suma del porcentaje de localizaciones con índice gingival 1, 2 y 3.
- Porcentaje de localizaciones con inflamación moderada. Se calcula el porcentaje de localizaciones se poseen un índice gingival igual a 2.
- Porcentaje de localizaciones con inflamación severa. Se calcula el porcentaje de localizaciones que poseen un índice gingival igual a 3.
- Con el fin de obtener un valor numérico que representara la reacción gingival a la placa, se estableció el cociente índice gingival / índice placa para cada individuo (Kinnby 1996, Abbas 1986, Trombelli 2004):

- De toda la boca.
- Del sector anterior (incisivos y caninos).
- Del sector posterior (premolaes y molares).
- De localizaciones interproximales (mesiales y distales).
- De caras libres (vestibulares y linguales).

De esta forma, a mayor valor de este cociente, mayor será la respuesta inflamatoria frente a una misma acumulación de placa.

- **Variables bioquímicas en saliva:**

- Concentración de progesterona.
- Concentración de estradiol.

- **Variables bioquímicas en FCG:**

- Concentración y cantidad de IL-1 β en FCG.
- Concentración y cantidad de PGE2 en FCG.

3.2. ESTADISTICA ANALÍTICA.

3.2.1. Estudio prospectivo a lo largo del embarazo.

El sujeto fue considerado como la unidad de análisis.

Debido a la pérdida de pacientes acontecida a lo largo del estudio fue necesario considerar tres grupos de mujeres:

- Aquellas que acuden a todas las visitas – visitas 1, 2, 3 y 4 - (IAS: *in all surveys*).
- Aquellas que acuden a todas las visitas durante el embarazo - visitas 1, 2 y 3 - (IAS-E).
- Aquellas que acuden a al menos una de las visitas (AVO: *all valid observations*).

Los tres grupos fueron comparados mediante un ANOVA para muestras repetidas, sin encontrarse diferencias significativas entre ellos en ninguno de los parámetros analizados y en ninguna de las visitas.

Para comprobar el ajuste a la normalidad de cada variable se aplicó *el test de Kolmogorov-Smirnov* a cada una de ellas. En aquellas variables con distribución normal se aplicaron test paramétricos y en aquellas con distribución no normal se aplicaron test no-paramétricos.

El análisis prospectivo de las variables paramétricas se realizó mediante un *análisis de la varianza (ANOVA) con medidas repetidas* en el factor tiempo. Dicho análisis se seleccionó gracias a que permite la evaluación simultánea de varias visitas. Además, se aplicaron las correcciones de Greenhouse-Geisser (que dan un resultado más conservador) para corregir las potenciales variaciones de la asunción de esfericidad. Esto se realizó independientemente del resultado del test de esfericidad (test de Mauchly). Tras ello, se realizaron comparaciones múltiples a posteriori para identificar el periodo o periodos de tiempo responsables de las diferencias.

En el caso de las variables no-paramétricas, dicho análisis se realizó mediante el *test de Friedman con la corrección de Bonferroni* junto con comparaciones *post hoc* para identificar la localización de las diferencias.

En cada variable realizaron dos análisis prospectivos: uno para IAS-E (n=42) y otro para IAS (n=26). Debido a la similitud de los datos encontrados y para evitar la reiteración de resultados, los datos que aparecen reflejados en este texto se corresponden con los datos de IAS-E para las visitas del embarazo (1º, 2º y 3º trimestre) (n=42) y de IAS para la visita de post-parto (n=26).

La comparación de las variables clínicas en función de la localización (anteriores frente a posteriores y caras libres frente a caras interproximales) se realizó mediante el test de Student, debido a la distribución normal de estas variables.

La correlación entre las variables paramétricas y no paramétricas se determinó mediante el coeficiente de Pearson y de Spearman, respectivamente.

Se seleccionó un valor de $p \leq 0,05$ para determinar diferencias significativas.

3.2.2. Comparativa entre ambos grupos de estudio.

Para estudiar la homogeneidad de los grupos de estudio se aplicó el test T-Student para la variable edad y el test χ^2 para el resto de variables sociodemográficas y para aquellas relacionadas con los antecedentes odontológicos.

Se realizaron dos análisis estadísticos entre ambos grupos de estudio, comparando las visitas de basal y 6 meses del grupo de no embarazadas:

- Con las visitas de primer y tercer trimestre (IAS-E) del grupo de embarazadas.
- Con la visita de postparto (IAS).

De esta forma se estudió el efecto del tiempo (6 meses) en un grupo de mujeres embarazadas y en un grupo de mujeres no embarazadas. Para ello se realizó un análisis de la varianza con medidas repetidas bifactorial. En el caso de que la interacción tiempo y grupo resultara estadísticamente significativa (ES), esto implicaba que el efecto del tiempo era diferente entre ambos grupos, por lo que había que estudiar cada grupo de forma individual. Si la interacción tiempo y grupo no era ES, se asumía que el efecto del tiempo era similar en ambos grupos de estudio, por lo que se podía determinar el efecto global del factor grupo en el resultado obtenido.

La comparación de ambos grupos de estudio en cada visita se realizó mediante el test T-Student, en el caso de las variables paramétricas y con el test U-Mann Whitney para muestras no pareadas, en el caso de las variables no-paramétricas.

Se seleccionó un valor de $p \leq 0,05$ para determinar diferencias significativas.

Capítulo IV.

RESULTADOS

1. Seguimiento.
2. Evolución del embarazo.
3. Comparación entre los grupos de estudio.

1. SEGUIMIENTO.

1.1. Grupo embarazo.

Sesenta mujeres que se encontraban en el primer trimestre del embarazo y que cumplían los criterios de inclusión / exclusión fueron invitadas a participar en el presente estudio. De ellas, 48 firmaron el consentimiento informado y aceptaron formar parte del mismo.

De las 48 mujeres que acudieron a la primera visita (AVO), tres sufren abortos espontáneos en el cuarto mes de embarazo, una experimenta parto prematuro en el séptimo mes, una es puesta en cuarentena para la tuberculosis en el sexto mes y otra rechaza acudir a la tercera visita por razones personales (falta de tiempo). Por tanto, 42 mujeres embarazadas son seguidas durante el primer, segundo y tercer trimestre del embarazo (IAS-E).

Tras el parto, 16 mujeres rechazan continuar en el estudio alegando razones personales (disponibilidad de tiempo) y debido a ello sólo 26 mujeres cumplen con las cuatro visitas del estudio (IAS).

El análisis estadístico no encuentra diferencias estadísticamente significativas (ES) en los parámetros analizados entre las mujeres que acuden a todas las visitas y las que sólo acuden a alguna de ellas (ANOVA para muestras repetidas). Para evitar la reiteración de datos, las tablas sólo reflejarán los resultados correspondientes a IAS-E (n=42) para las visitas correspondientes a primer, segundo y tercer trimestre del embarazo y de IAS (n=26), para la visita correspondiente a los tres meses tras el parto.

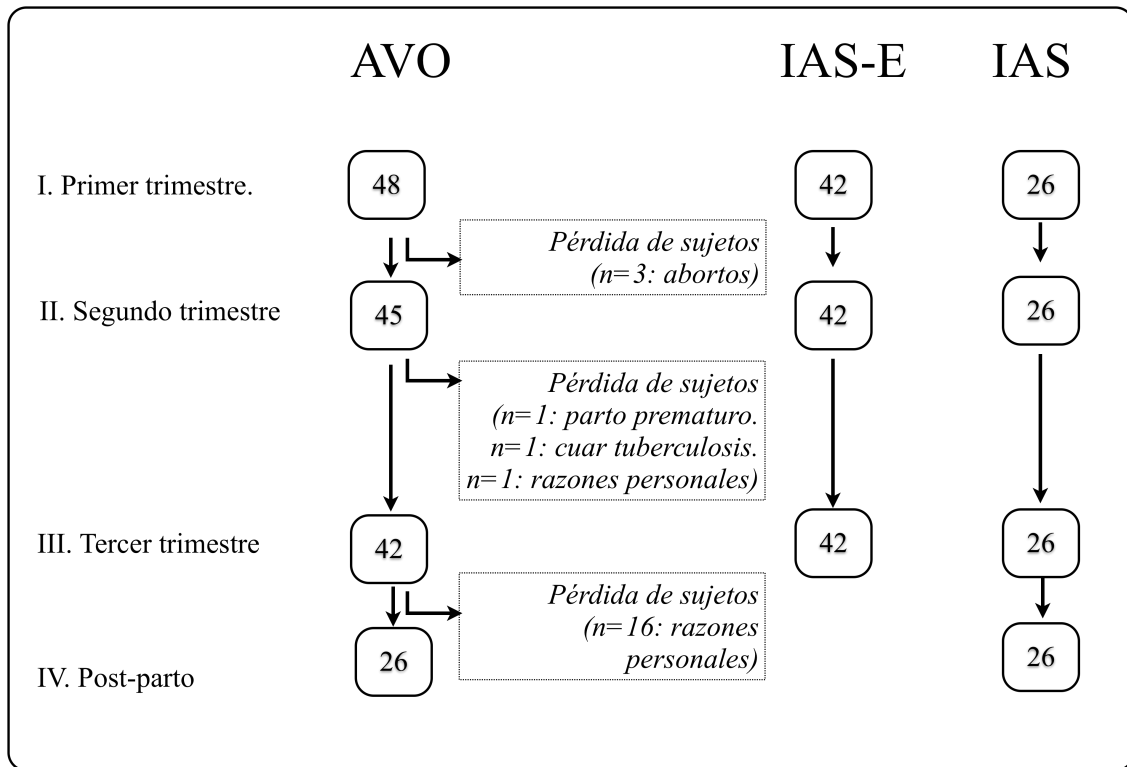


Figura 32: Seguimiento del grupo embarazo.

AVO: all valid observations: mujeres que acuden a al menos una visita del estudio.

IAS: in all surveys: mujeres que acuden a todas las visitas del estudio (n=26).

IAS-E: mujeres que acuden a todas las visitas correspondientes al embarazo (n=42).

Cuar tuberculosis: cuarentena frente a la tuberculosis.

1. 2. Grupo no embarazo.

Treinta mujeres no embarazadas que cumplían los criterios de inclusión / exclusión previamente expuestos fueron invitadas a participar en el presente estudio. De ellas, 28 firmaron el consentimiento informado del estudio y aceptaron formar parte del mismo.

De las 28 mujeres que acudieron a la primera visita (AVO), cuatro comenzaron a tomar anticonceptivos orales tras la primera visita y fueron excluidas del estudio. Además, otras cuatro mujeres rechazaron acudir a la segunda visita por razones personales (disponibilidad horaria). Por tanto, 20 mujeres fueron seguidas los seis meses del estudio (IAS).

El análisis estadístico no encuentra diferencias ES en los parámetros analizados entre las mujeres que acuden a todas las visitas y las que sólo acuden a alguna de ellas (ANOVA para muestras repetidas). Para evitar la reiteración de datos, las tablas sólo reflejarán los resultados correspondientes a IAS (n=20).

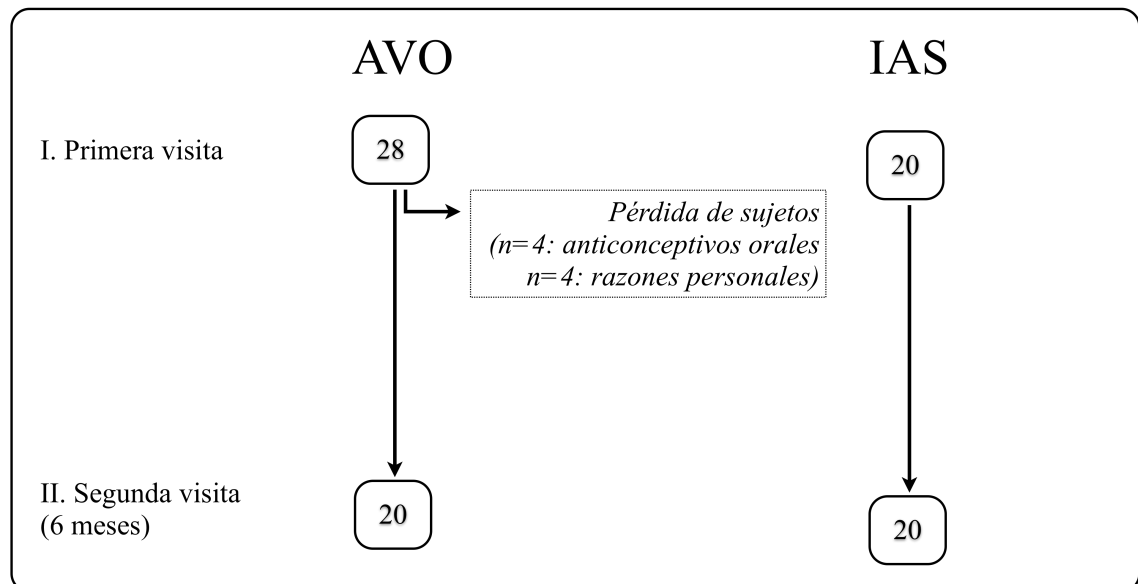


Figura 33: Seguimiento del grupo de mujeres no embarazadas.

AVO: Acuden a al menos una de las visitas; IAS: acuden a todas las visitas (n=20).

2. EVOLUCIÓN DEL EMBARAZO

2.1. Variables clínicas.

2.1.1. Índice de placa.

- A lo largo del embarazo no se encontró un efecto del tiempo estadísticamente significativo (ES) ($p=0,298$).
- En la visita inicial, el valor del índice de placa fue de $0,71 \pm 0,43$.
- En el segundo trimestre del embarazo, se observó una reducción no ES ($p=0,177$) del índice de placa, alcanzando un valor de $0,65 \pm 0,30$.
- En el tercer trimestre del embarazo, el índice de placa se mantuvo estable con un valor de $0,68 \pm 0,30$ ($p=0,288$).
- Tres meses tras el parto, los valores del índice de placa se incrementaron de forma no ES ($p=0,082$) respecto al tercer trimestre del embarazo, alcanzando niveles similares a los que existían en el primer trimestre del mismo ($0,72 \pm 0,28$).

Índice de placa (toda la boca)				
	1º trimestre n=42	2º trimestre n=42	3º trimestre n=42	Post-parto n=26
Media (DE)	0,71 (0,43)	0,65 (0,33)	0,68 (0,30)	0,72 (0,28)
p^a		0,177	0,288	0,082

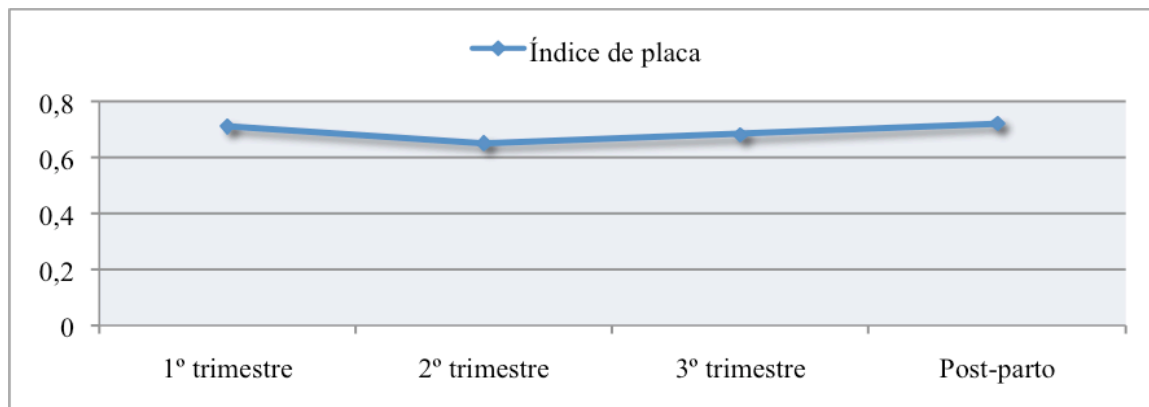


Tabla 9 y Figura 34: Evolución del índice de placa correspondiente a toda la boca a lo largo del embarazo y tres meses tras el parto.

^a ANOVA para muestras repetidas. Significación al comparar cada periodo con el inmediatamente anterior

Dientes anteriores frente a dientes posteriores

- A lo largo de todo el embarazo los dientes posteriores presentaron un índice de placa estadísticamente superior que los dientes anteriores ($p < 0,01$). Tras el parto, las diferencias entre dientes anteriores y posteriores desaparecieron ($p = 0,075$).
- En cuanto a la evolución del índice de placa en cada sector, los dientes anteriores presentaron una tendencia no ES a la reducción en los valores del índice de placa durante el periodo del embarazo, que se invirtió tres meses tras el parto, con un incremento ES en el mismo ($p = 0,016$). Los dientes posteriores no experimentaron cambios ES en el índice de placa a lo largo del embarazo.

Índice de placa				
	1º trimestre n=42	2º trimestre n=42	3º trimestre n=42	Post-parto n=26
Anteriores	0,66 (0,46)	0,60 (0,36)	0,61 (0,35)	0,68 (0,33)* ^a
Posteriores	0,75 (0,43)	0,69 (0,36)	0,73 (0,29)	0,76 (0,28)
<i>p^b</i>	<i>0,030</i>	<i>0,010</i>	<i>0,002</i>	<i>0,075</i>

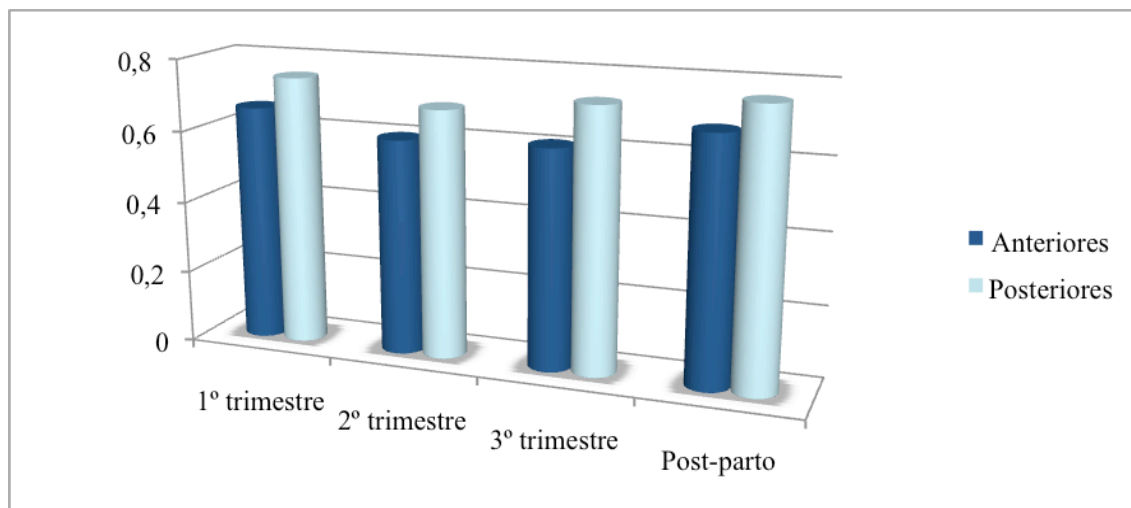


Tabla 10 y Figura 35: Evolución del índice de placa en dientes anteriores y posteriores.

^a Evolución prospectiva del índice de placa a lo largo del embarazo y tras el parto en dientes anteriores y posteriores. ANOVA para muestras repetidas. * $p < 0,05$.

^b Comparación del índice de placa en dientes anteriores frente a posteriores. Test T-Student.

Caras libres y caras interproximales

- A lo largo de todo el embarazo las caras libres presentaron un índice de placa estadísticamente superior que las caras interproximales ($p < 0,001$). Esta diferencia se mantuvo tres meses tras el parto ($p < 0,001$).
- En cuanto a la evolución del índice de placa, tanto las caras libres como las caras interproximales no sufrieron cambios ES a lo largo del embarazo. Tras el parto, ambas localizaciones incrementaron sus valores de índice de placa de forma ES ($p = 0,047$ y $p = 0,018$, para las caras interproximales y para las libres, respectivamente.)

Índice de placa				
	1º trimestre n=42	2º trimestre n=42	3º trimestre n=42	Post-parto n=26
Interproximales	0,63 (0,43)	0,56 (0,33)	0,59 (0,30)	0,64 (0,28)* ^a
Libres	0,79 (0,44)	0,74 (0,36)	0,76 (0,33)	0,81 (0,31)* ^a
<i>p^b</i>	<i><0,001</i>	<i><0,001</i>	<i><0,001</i>	<i><0,001</i>

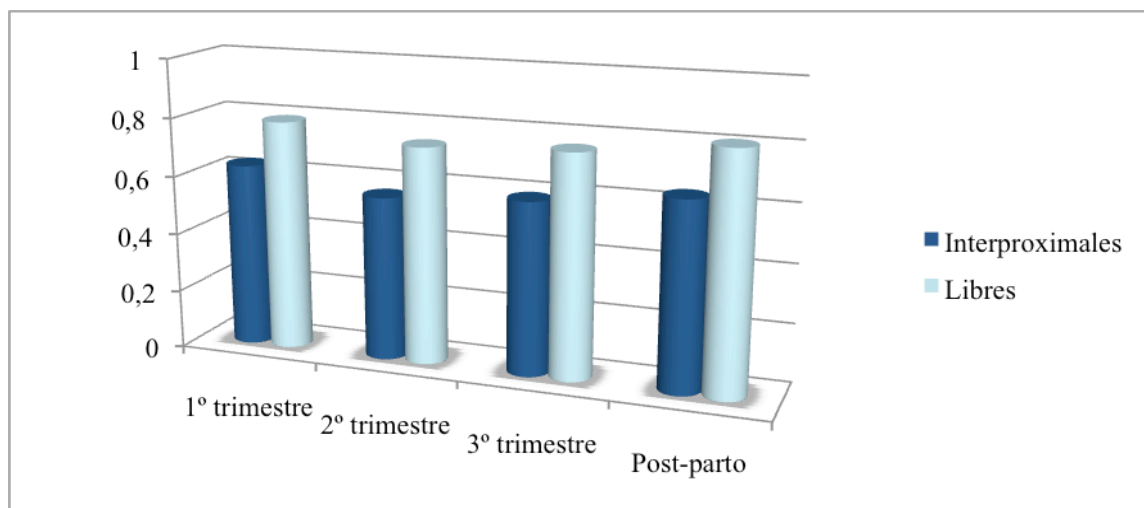


Tabla 11 y Figura 36: Evolución del índice de placa en caras interproximales y libres.

^a Evolución prospectiva del índice de placa a lo largo del embarazo y tras el parto en caras interproximales y caras libres. ANOVA para muestras repetidas. * $p < 0,05$.

^b Comparación del índice de placa en caras interproximales frente a caras libres. Test T-Student.

Porcentajes (Presencia / ausencia de placa)

- Al transformar el índice del placa en dicotómico (presencia / ausencia de placa), se obtuvo que un 52,97% de las localizaciones presentaron placa en el primer trimestre, frente a un 49,31% en el segundo trimestre y un 52,67% en el tercero, no existiendo diferencias ES a lo largo del embarazo ($p=0,268$).
- Tras el parto, el porcentaje de localizaciones con placa aumentó de forma ES ($p=0,027$) hasta alcanzar un valor de 57,82%.

Índice de placa (%) (toda la boca)				
	1º trimestre n=42	2º trimestre n=42	3º trimestre n=42	Post-parto n=26
Media (DE)	52,97 (24,02)	49,31 (19,50)	52,67 (19,70)	57,82 (20,17)
<i>p^a</i>		0,188	0,061	0,027

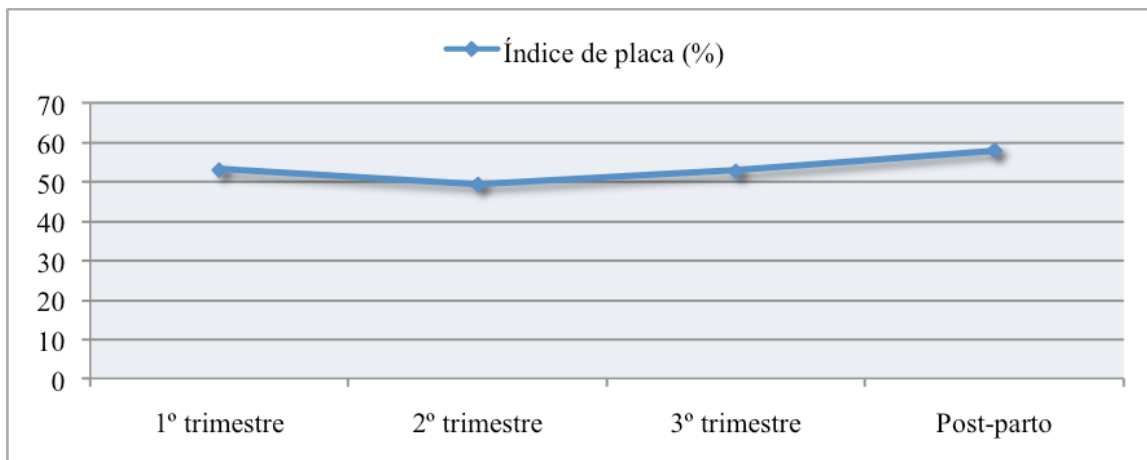


Tabla 12 y Figura 37: Evolución del porcentaje de localizaciones con placa.

^a ANOVA para muestras repetidas. Significación al comparar cada periodo con el inmediatamente anterior.

2.1.2. Índice gingival.

- A lo largo del embarazo se observó un efecto del tiempo ES ($p=0,034$).
- En la visita inicial, el valor del índice gingival fue de $1,01 \pm 0,41$.
- En el segundo trimestre del embarazo, se encontró un incremento ES del índice gingival ($p=0,039$), alcanzando un valor de $1,13 \pm 0,43$.
- En el tercer trimestre del embarazo, el índice gingival se mantuvo con un valor de $1,14 \pm 0,44$ ($p=0,917$). El valor del índice gingival en el tercer trimestre fue significativamente superior al del primer trimestre ($p=0,025$).
- Tres meses tras el parto, el índice gingival disminuyó de forma no ES ($p=0,086$) hasta alcanzar un valor de $0,98 \pm 0,40$.

Índice gingival (toda la boca)				
	1º trimestre n=42	2º trimestre n=42	3º trimestre n=42	Post-parto n=26
Media (DE)	1,01 (0,41)	1,13 (0,43)	1,14 (0,44)	0,98 (0,40)
p^a		0,039	0,917	0,086

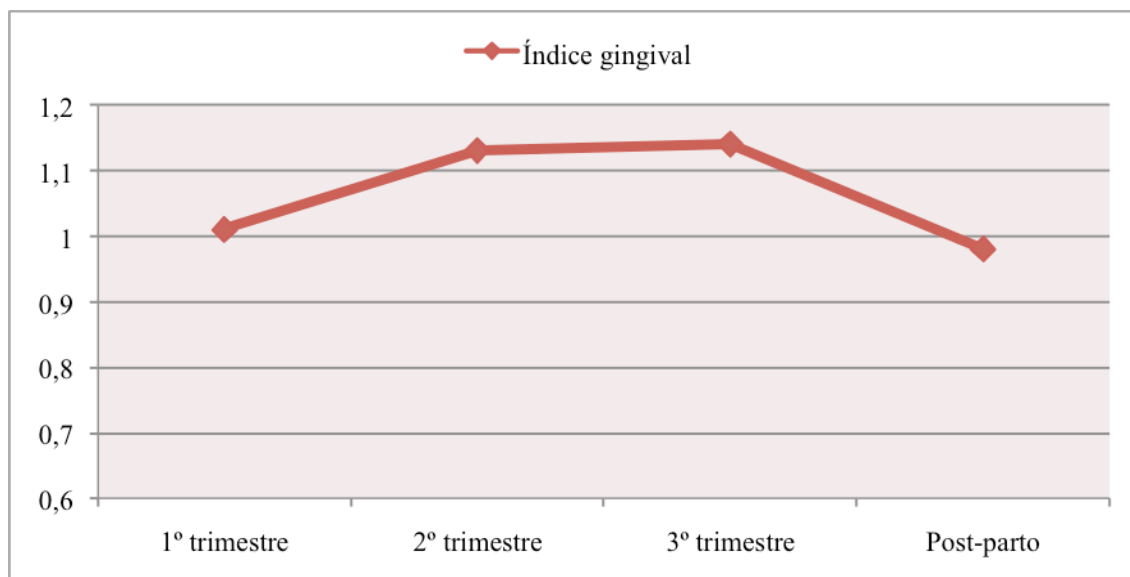


Tabla 13 y Figura 38: Evolución del índice gingival de toda la boca a lo largo del embarazo y tres meses tras el parto.

^a ANOVA para muestras repetidas. Significación al comparar cada periodo con el inmediatamente anterior.

Dientes anteriores frente a dientes posteriores

- En el primer trimestre del embarazo, los dientes posteriores presentaron mayores valores de índice gingival que los dientes anteriores ($p=0,022$). En el segundo y tercer trimestre del embarazo y tres meses tras el parto, las diferencias entre dientes anteriores y posteriores desapareció ($p>0,05$).
- En cuanto a la evolución del índice gingival en cada sector, los dientes anteriores sufrieron un incremento ES en el índice gingival entre el primer y el segundo trimestre del embarazo ($p=0,015$), que se mantuvo hasta el tercer trimestre. Tras el parto se observó una reducción no ES en el índice gingival.
- Los dientes posteriores presentaron la misma tendencia general que los dientes anteriores, aunque en ellos no se encontraron diferencias ES ($p=0,212$).

Índice gingival				
	1º trimestre n=42	2º trimestre n=42	3º trimestre n=42	Post-parto n=26
Anteriores	0,95 (0,50)	1,12 (0,50)* ^a	1,10 (0,54)	0,93 (0,39)
Posteriores	1,06 (0,40)	1,14 (0,42)	1,16 (0,43)	1,02 (0,45)
p^b	0,022	0,406	0,200	0,125

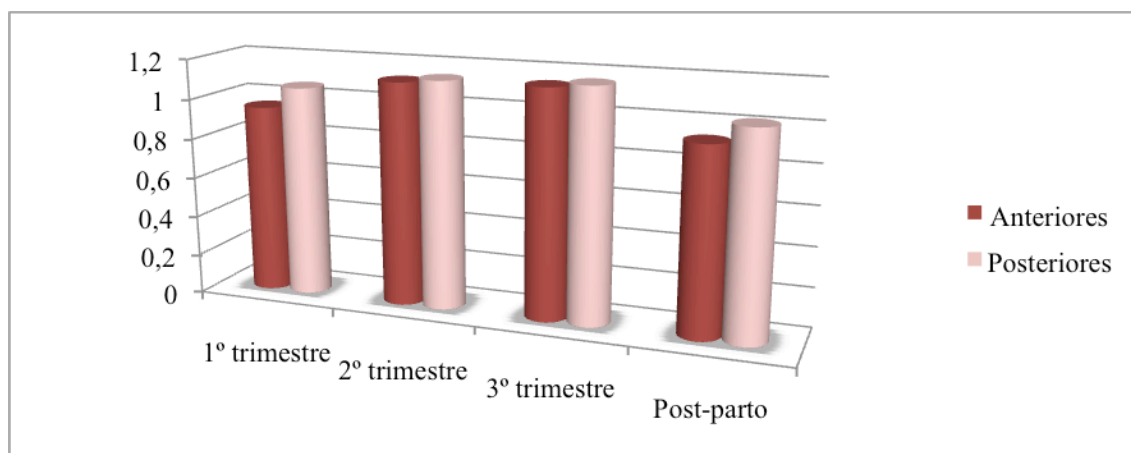


Tabla 14 y Figura 39: Evolución del índice gingival de dientes anteriores y posteriores.

^a Evolución prospectiva del índice gingival a lo largo del embarazo y tras el parto en los dientes anteriores y posteriores. ANOVA para muestras repetidas. ** $p<0,05$.

^b Comparación del índice de placa en los dientes anteriores y posteriores. Test T-Student.

Caras interproximales frente a caras libres

- A lo largo de todo el embarazo y tres meses tras el parto, las caras libres presentaron mayores valores de índice gingival que las caras interproximales ($p<0,001$).
- El valor del índice gingival de las localizaciones interproximales se incrementó de forma ES entre el primer y el segundo trimestre ($p=0,037$), manteniéndose constante el resto del embarazo. Tras el parto se observó una reducción no ES ($p=0,054$) en el índice gingival de las caras interproximales. El valor del índice gingival de las caras libres no cambió a lo largo del embarazo ($p>0,05$).

Índice gingival				
	1º trimestre n=42	2º trimestre n=42	3º trimestre n=42	Post-parto n=26
Interproximales	0,90 (0,47)	1,05 (0,46)* ^a	1,05 (0,48)	0,83(0,43)
Libres	1,12 (0,40)	1,21 (0,43)	1,23 (0,44)	1,12 (0,40)
p^b	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

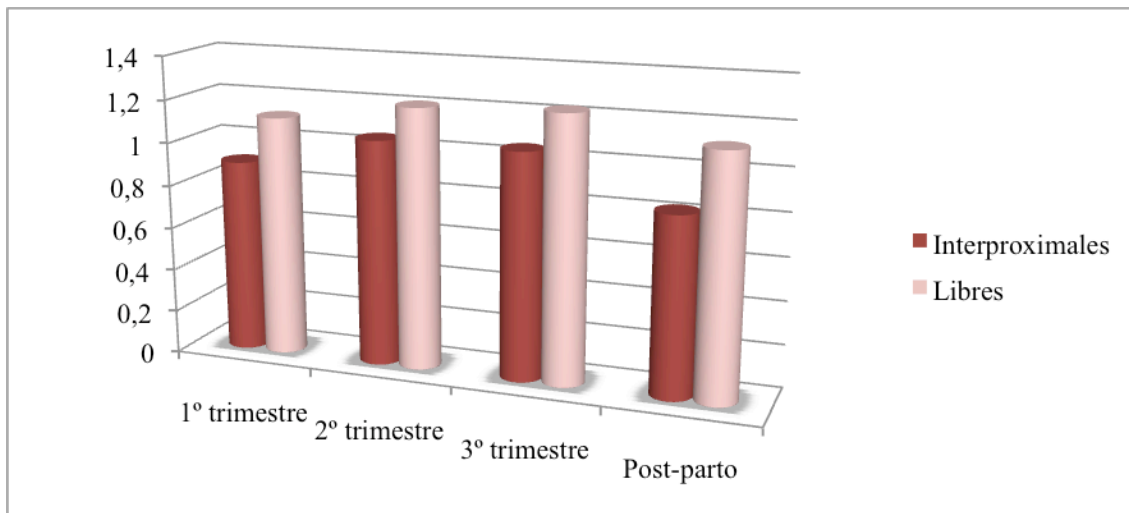


Tabla 15 y Figura 40: Evolución del índice gingival en caras interproximales y libres.

^a Evolución prospectiva del índice gingival a lo largo del embarazo y tras el parto en las caras interproximales y las libres. ANOVA para muestras repetidas. ** $p<0,05$.

^b Comparación del índice de placa en las caras interproximales y las libres. Test T-Student.

Frecuencia de distribución

- Al analizar los datos en forma de porcentajes, se observa que entre el primer y el segundo trimestre del embarazo se produjo un incremento ES en el porcentaje de localizaciones con sangrado ($p<0,05$), con inflamación ($p<0,05$) y con inflamación moderada ($p<0,01$).
- Entre el segundo y el tercer trimestre del embarazo se duplicó el porcentaje de localizaciones con inflamación severa (2 a 4%; $p<0,05$).
- Tres meses tras el parto, el porcentaje de localizaciones con sangrado e inflamación se redujo, aunque esta disminución no fue ES ($p<0,05$). Lo mismo ocurrió con el porcentaje de localizaciones con inflamación moderada y severa.

Porcentajes – media (DE)				
	1º trimestre n=42	2º trimestre n=42	3º trimestre n=42	Post-parto n=26
Sangrado	46,46 (17,96)	52,45 (19,40)	51,60 (19,33)	45,98 (19,23)
<i>p^a</i>		0,027	0,286	0,314
Inflamación	51,44 (20,18)	57,53 (20,69)	56,44 (20,97)	49,92 (20,04)
<i>p^a</i>		0,037	0,370	0,089
Inf. moderada	43,78 (15,47)	50,80 (17,84)	48,14 (16,97)	45,57 (18,23)
<i>p^a</i>		0,009	0,655	0,586
Inf. severa	3,00 (6,70)	2,00 (4,60)	4,00 (6,30)	1,00 (2,10)
<i>p^a</i>		0,648	0,035	0,082

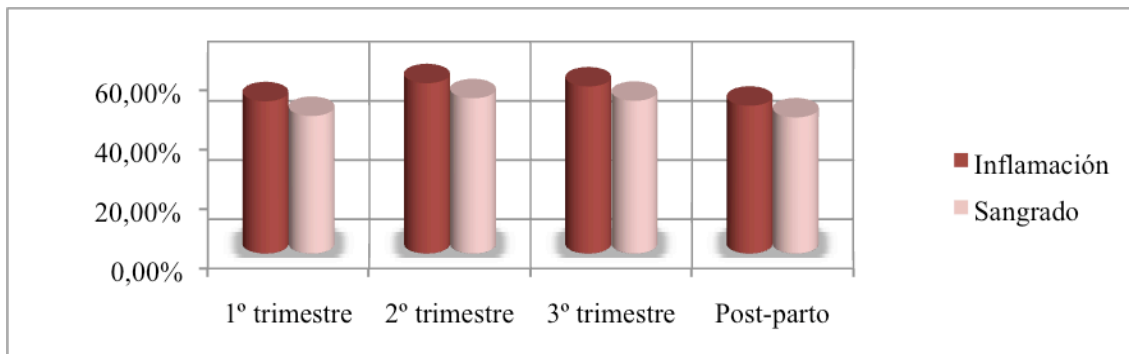


Tabla 16 y Figura 41: Evolución del porcentaje de localizaciones con sangrado, inflamación, inflamación moderada (IG=2) e inflamación severa (IG=3) en toda la boca.

^a ANOVA para muestras repetidas. Significación al comparar cada periodo con el inmediatamente anterior.

2.1.3. Reactividad gingival frente a la placa

Para estudiar la respuesta inflamatoria frente a la acumulación de placa se calculó el cociente entre el índice gingival y el índice de placa en cada una de las embarazadas y en cada visita; de tal modo, que a mayor valor de este cociente, mayor grado de inflamación frente a una misma acumulación de placa.

- A lo largo del embarazo se observó un efecto del tiempo ES ($p=0,005$).
- En la visita inicial, el valor del IG/IP fue de $1,70 \pm 0,86$.
- En el segundo trimestre del embarazo, se produjo un incremento ES ($p=0,002$), alcanzando un valor de $1,93 \pm 0,72$.
- En el tercer trimestre del embarazo, el IG/IP se mantuvo con un valor de $1,85 \pm 0,78$ ($p=0,203$).
- Tres meses tras el parto, el valor de IG/IP se redujo de forma ES ($p<0,001$) hasta alcanzar un valor de $1,53 \pm 0,99$.

IG/IP (toda la boca)				
	1º trimestre n=42	2º trimestre n=42	3º trimestre n=42	Post-parto n=26
Media (DE)	1,70 (0,86)	1,93 (0,72)	1,85 (0,78)	1,53 (0,99)
p^a		0,002	0,203	<0,001

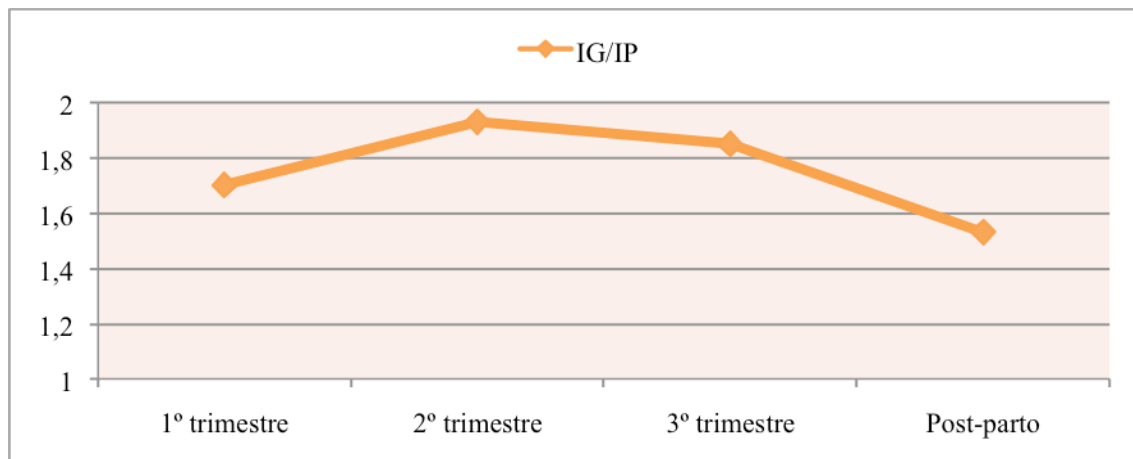


Tabla 17 y Figura 42: Evolución de la variable IG/IP de toda la boca a lo largo del embarazo y tres meses tras el parto.

^a Test de Friedman con correcciones de Bonferroni. Significación al comparar cada periodo con el inmediatamente anterior.

Dientes anteriores y dientes posteriores

- En general, los dientes anteriores presentaron mayores valores de IG/IP que los dientes posteriores, aunque esta diferencia sólo fue ES en el tercer trimestre del embarazo ($p < 0,05$).
- El análisis independiente de los dientes anteriores y de los posteriores no reflejó cambios ES a lo largo del embarazo.
- Tras el parto, la variable IG/IP se redujo tanto en dientes anteriores como en dientes posteriores ($p < 0,001$).

IG/IP				
	1º trimestre n=42	2º trimestre n=42	3º trimestre n=42	Post-parto n=26
Anteriores	2,09 (1,76)	2,23 (1,31)	2,94 (5,80)	1,79 (1,75)*** ^a
Posteriores	1,67 (0,80)	1,89 (0,79)	1,72 (0,79)	1,46 (0,80)*** ^a
<i>p</i>^b	0,496	0,175	0,022	0,086

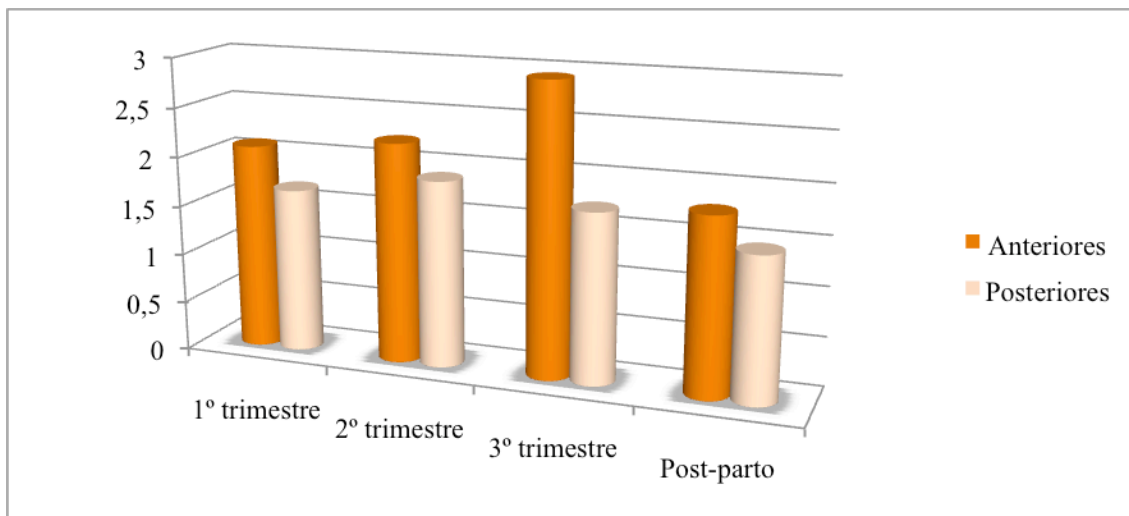


Tabla 18 y Figura 43: Evolución de IG/IP en dientes anteriores y posteriores.

^a Evolución prospectiva de la variable IG/IP a lo largo del embarazo y tras el parto en los dientes anteriores y posteriores. Test de Friedman con correcciones de Bonferroni. *** $p < 0,001$.

^b Comparación de la variables IG/IP en los dientes anteriores y posteriores. Prueba de los rangos de Wilcoxon.

Caras interproximales y caras libres

- En general, las localizaciones interproximales presentaron mayores valores de IG/IP que las localizaciones libres, siendo esta diferencia ES en el segundo (p=0,010) y tercer trimestre del embarazo (p=0,029).
- El análisis de las caras interproximales aisladas indica que en el segundo trimestre se produjo un incremento ES en el valor de IG/IP (p=0,029). Tras el parto se observa una reducción no ES en el IG/IP (p=0,126).
- El análisis de las caras libres no refleja cambios ES a lo largo de todo el embarazo, aunque el máximo valor se alcanzó en el segundo trimestre del mismo. Tras el parto, el valor de IG/IP en las caras libres se redujo de forma ES (p=0,037).

IG/IP				
	1º trimestre n=42	2º trimestre n=42	3º trimestre n=42	Post-parto n=26
Interproximales	1,77 (0,99)	2,19 (1,12)* ^a	2,12 (1,23)	1,67 (1,73)
Libres	1,68 (0,86)	1,81 (0,69)	1,78 (0,76)	1,52 (0,72)* ^a
p^b	0,553	0,010	0,029	0,367

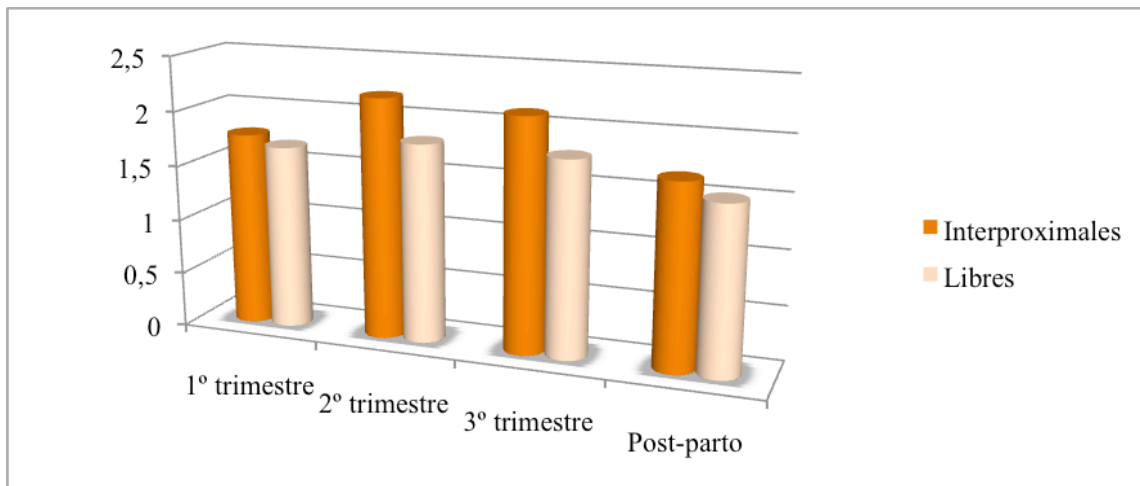


Tabla 19 y Figura 44: Evolución de IG/IP en caras interproximales y libres.

^a Evolución prospectiva de la variable IG/IP a lo largo del embarazo y tras el parto en las caras interproximales y las libres. Test de Friedman con correcciones de Bonferroni. **p<0,05.

^b Comparación de la variable IG/IP en las caras interproximales y las libres. Prueba de los rangos de Wilcoxon.

Alta y baja reactividad a la placa

El grupo de mujeres embarazadas fue dividido en dos subgrupos en función de si los valores de IG/IP se encontraban por debajo o por encima de la mediana en el segundo trimestre del embarazo: grupo de “baja” (BR o “alta” reactividad (AR) frente a la placa, respectivamente (Kinnby et al. 1996).

- Al comparar ambos grupos se observa que el grupo con AR presenta un efecto significativo del tiempo a lo largo del embarazo ($p < 0,001$) con un incremento ES de IG/IP en el segundo trimestre, frente al grupo de BR en el que no se observan cambios a lo largo del embarazo ($p = 0,717$). En ambos grupos se produce una reducción ES en el valor de IG/IP tres meses tras el parto.
- Las diferencias entre ambos grupos son ES a lo largo de todo el embarazo. Sin embargo, tres meses tras el parto dichas diferencias desaparecen.

IG/IP				
	1º trimestre n=21	2º trimestre n=21	3º trimestre n=21	Post-parto n=12
Alta reactiv.	1,85 (0,80)	2,46 (0,59) ^{***a}	2,17 (0,85)	1,72 (1,25) ^{*a}
Baja reactiv.	1,55 (0,92)	1,39 (0,35)	1,52 (0,56)	1,27 (0,38) ^{**a}
<i>p^b</i>	<i>0,036</i>	<i><0,001</i>	<i>0,006</i>	<i>0,484</i>

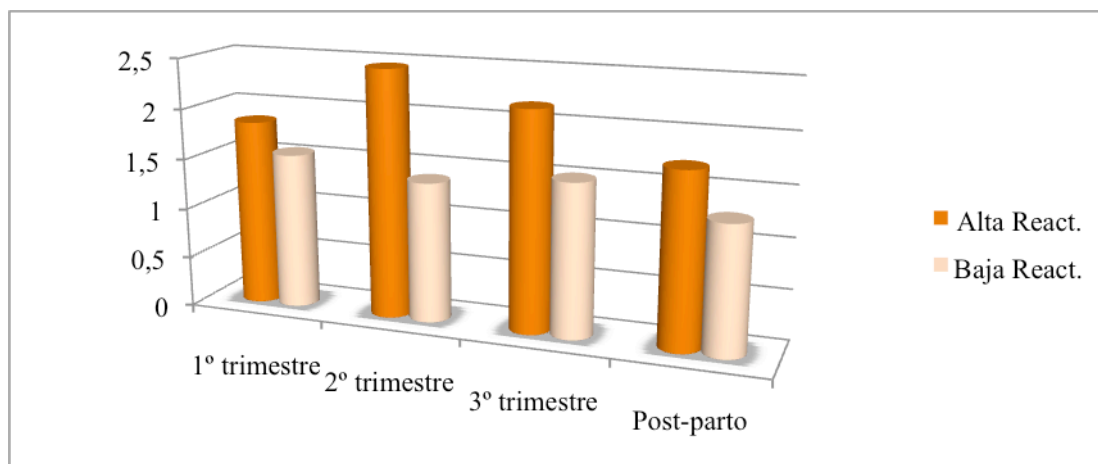


Tabla 20 y Figura 45: Evolución de IG/IP en los grupos con AR y BR.

^a Evolución prospectiva de la variable IG/IP a lo largo del embarazo y tras el parto en los grupos con AR y BR. Test de Friedman con correcciones de Bonferroni: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

^b Comparación de la variable IG/IP en los grupos con AR y BR. Prueba de Mann-Whitney.

2.2. Niveles de hormonas en saliva

2.2.1. Progesterona

- A lo largo del embarazo se observa un efecto del tiempo ES ($p<0,001$).
- En la visita inicial, la concentración de progesterona en saliva fue de $249,75\pm196,03$ pg/ml.
- En el segundo trimestre del embarazo, se observa un incremento ES ($p=0,005$) en esta concentración, alcanzando un valor de $545,14\pm344,83$ pg/ml.
- En el tercer trimestre, la concentración de progesterona en saliva volvió a aumentar de forma ES para alcanzar un valor de $1543,10\pm760,38$ pg/ml ($p<0,001$).
- Tras el parto, los niveles de progesterona en saliva se redujeron drásticamente, llegando a niveles inferiores a los que existían en el primer trimestre del embarazo ($11,11\pm20,16$ pg/ml; $p<0,001$).

Progesterona (pg/ml)				
	1º trimestre n=42	2º trimestre n=42	3º trimestre n=42	Post-parto n=26
Media (DE)	249,75 (196,03)	545,14 (344,83)	1543,10 (760,38)	11,11(20,16)
<i>p^a</i>		0,005	<0,001	<0,001

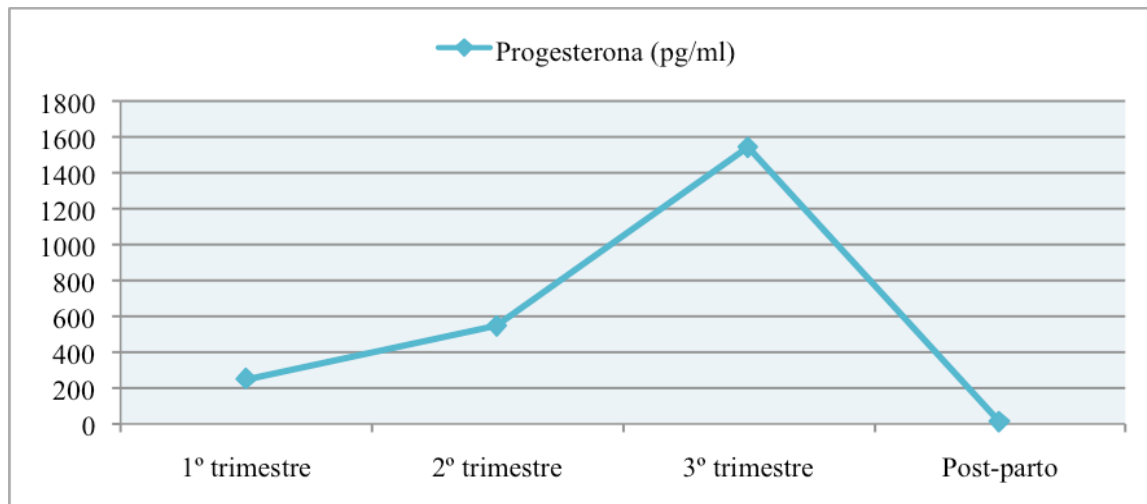


Tabla 21 y Figura 46: Evolución de la concentración de progesterona en saliva a lo largo del embarazo y tres meses tras el parto.

^a Test de Friedman con correcciones de Bonferroni. Significación al comparar cada periodo con el inmediatamente anterior.

2.2.2. Estradiol.

- A lo largo del embarazo se observa un efecto del tiempo ES ($p<0,001$).
- En la visita inicial, la concentración de estradiol en saliva fue de $0,96\pm 2,56$ pg/ml.
- En el segundo trimestre del embarazo, se observa un incremento ES ($p<0,005$) en esta concentración, alcanzando un valor de $4,94\pm 12,35$ pg/ml.
- En el tercer trimestre, la concentración de estradiol en saliva volvió a aumentar de forma ES para alcanzar un valor de $24,38\pm 32,12$ pg/ml ($p<0,05$).
- Tras el parto, los niveles de estradiol en saliva cayeron drásticamente, llegando a valores inferiores a los que existían en el primer trimestre del embarazo ($0,02\pm 0,09$ pg/ml; $p<0,001$).

Estradiol (pg/ml)				
	1º trimestre n=42	2º trimestre n=42	3º trimestre n=42	Post-parto (n=26)
Media (DE)	0,96 (2,56)	4,94 (12,35)	24,38 (32,12)	0,02 (0,09)
<i>p^a</i>		<i>0,013</i>	<i>0,021</i>	<i><0,001</i>

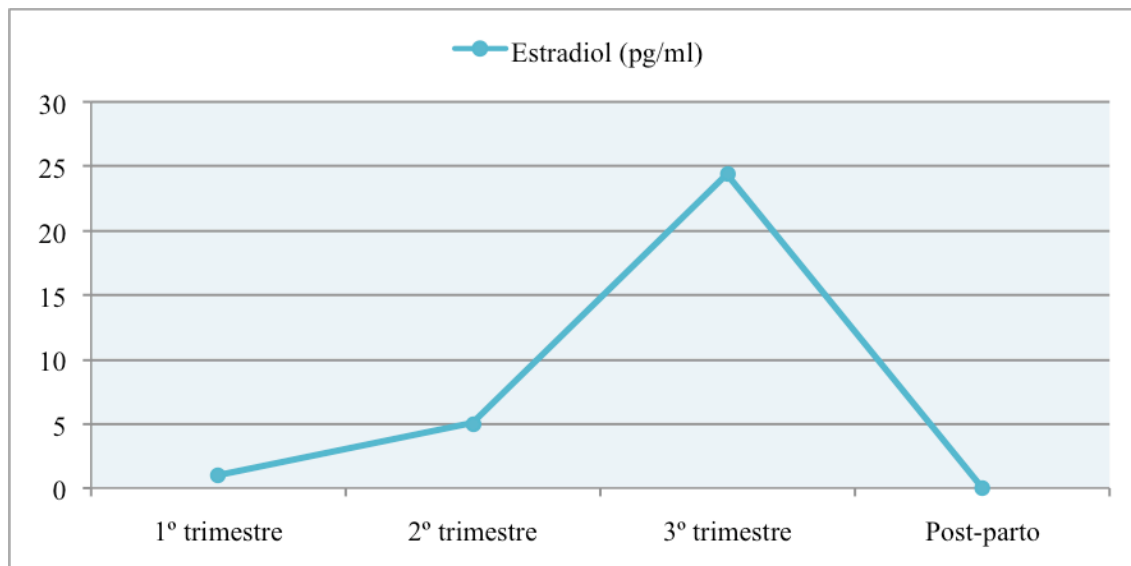


Tabla 22 y Figura 47: Evolución de la concentración de estradiol en saliva a lo largo del embarazo y tres meses tras el parto.

^a Test de Friedman con correcciones de Bonferroni. Significación al comparar cada periodo con el inmediatamente

2.3. Variables bioquímicas en FCG

2.3.1. Interleuquina 1 β

Cantidad de IL-1 β

- De forma global, la cantidad de IL-1 β no presentó diferencias ES a lo largo del embarazo ($p=0,076$).
- En el primer trimestre la cantidad de IL-1 β en FCG fue de $30,05 \pm 27,05$ pg.
- En el segundo trimestre, se observó una reducción no ES en esta cantidad, alcanzando un valor de $23,28 \pm 22,98$ pg ($p=0,312$).
- En el tercer trimestre, la cantidad de IL-1 β aumentó de forma no ES alcanzando niveles similares a los del primer trimestre ($30,45 \pm 24,61$ pg; $p=0,058$).
- Tras el parto, la cantidad del IL-1 β en FCG se redujo hasta valores inferiores a los que existían en el primer trimestre del embarazo ($17,46 \pm 16,64$ pg). Esta reducción fue ES ($p=0,001$).

IL-1 β (pg)				
	1º trimestre n=42	2º trimestre n=42	3º trimestre n=42	Post-parto n=26
Media (DE)	30,05 (27,05)	23,28 (22,98)	30,45(24,61)	17,46 (16,64)
p^a		0,312	0,058	0,001

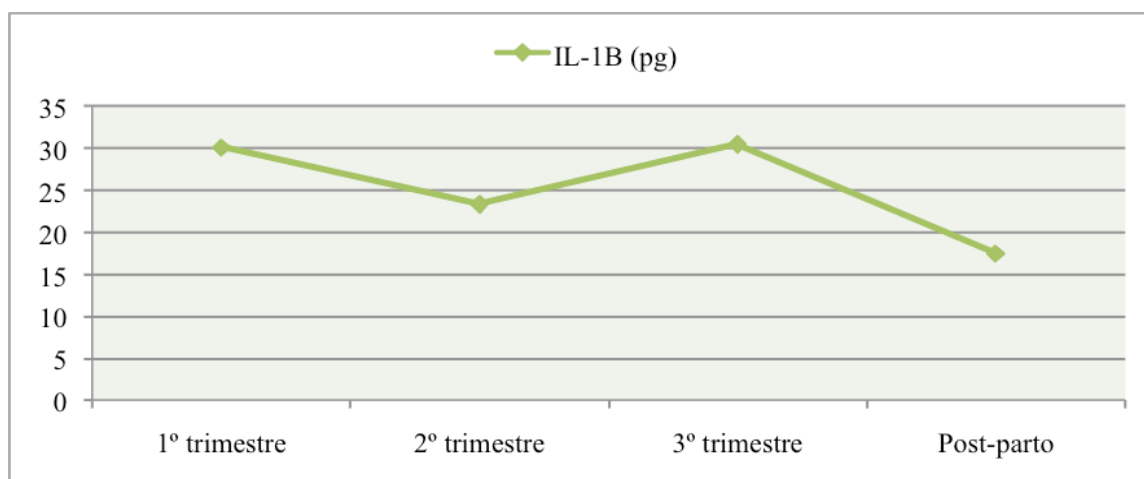


Tabla 23 y Figura 48: Evolución de los valores de la cantidad de IL-1 β en FCG a lo largo del embarazo y tres meses tras el parto.

^a Test de Friedman con correcciones de Bonferroni. Significación al comparar cada periodo con el inmediatamente anterior.

Concentración de IL-1 β

- De forma global, la concentración de IL-1 β no presentó diferencias ES a lo largo del embarazo ($p=0,660$).
- En el primer trimestre, la concentración de IL-1 β en FCG fue de $73,12\pm 57,93$ ng/ml
- En el segundo trimestre, se observó una reducción no ES en esta concentración, alcanzando un valor de $70,01\pm 69,68$ ng/ml ($p=0,765$).
- En el tercer trimestre, la concentración de IL-1 β aumentó de forma no ES hasta alcanzar un valor de $85,27\pm 69,66$ ng/ml ($p=1,000$).
- Tras el parto, la concentración del IL-1 β en FCG se redujo hasta valores inferiores a los que existían en el primer trimestre del embarazo ($51,78\pm 53,58$ ng/ml). Esta reducción fue ES ($p=0,020$).

IL-1 β (ng/ml)				
	1º trimestre n=42	2º trimestre n=42	3º trimestre n=42	Post-parto n=26
media (DE)	73,12 (57,93)	70,01 (69,68)	85,27 (69,66)	51,78 (53,58)
p^a		0,765	1,000	0,020

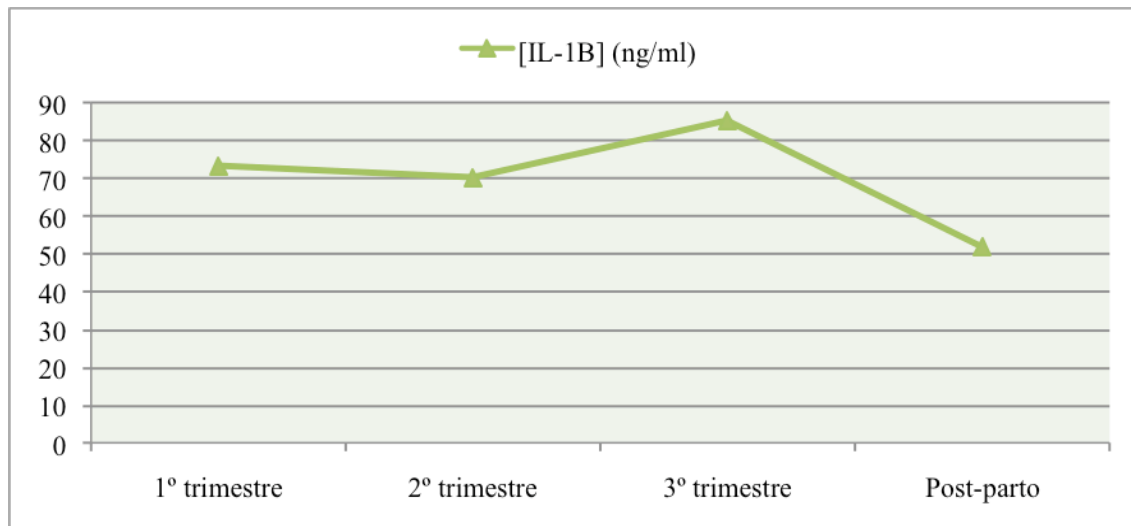


Tabla 24 y Figura 49: Evolución de la concentración de IL-1 β en FCG a lo largo del embarazo y tres meses tras el parto.

^a Test de Friedman con correcciones de Bonferroni. Significación al comparar cada periodo con el inmediatamente anterior.

Alta y baja reactividad frente a la placa

- No se encontraron diferencias ES entre los grupos con alta y baja reactividad frente a la placa en función de los niveles de IL-1 β en FCG en ninguno de los periodos analizados.

IL-1β					
Baja reactividad			Alta reactividad		Valor de p ^b
n	Media (SD)	n	Media (SD)		
Cantidad (pg)					
1° trimestre	21	30,28 (27,80)	21	29,81 (26,95)	0.814
2° trimestre	21	26,06 (29,30)	21	20,00 (13,56)	0.734
3° trimestre	21	26,26 (23,13)	21	34,35 (25,36)* ^a	0.274
Post-parto	11	18,32 (19,56)* ^a	11	20,41 (16,71)* ^a	0.815
Concentración (ng/ml)					
1° trimestre	21	65,87 (46,15)	21	84,86 (68,46)	0.531
2° trimestre	21	79,25 (86,07)	21	55,79 (42,34)	0.850
3° trimestre	21	73,07 (66,11)	21	94,50 (71,03)	0.230
Post-parto	11	63,19 (65,55)	11	45,68 (37,83)	0.586

Tabla 25: Niveles de IL-1 β en los grupos con alta y baja reactividad.

^a Test de Friedman con correcciones de Bonferroni. Significación al comparar cada periodo con el inmediatamente anterior. *:p<0,05.

^b Test de Mann-Whitney. Comparación entre los grupos con alta y baja reactividad en cada periodo de estudio.

2.3.2. Prostaglandina E2

Cantidad de prostaglandina E2 (PGE2)

- De forma global, la cantidad de PGE2 no presentó diferencias ES a lo largo del embarazo ($p=0,660$).
- En el primer trimestre la cantidad de PGE2 en FCG fue de $19,85 \pm 6,77$ pg.
- En el segundo trimestre, la concentración de PGE2 fue muy similar a la del primer trimestre ($19,46 \pm 7,38$ pg; $p=1,000$).
- En el tercer trimestre, la cantidad de PGE2 aumentó de forma no ES alcanzando un valor de $21,41 \pm 10,41$ pg ($p=0,162$).
- Tres meses tras el parto, la cantidad de PGE2 se mantuvo en valores similares a los del embarazo ($20,71 \pm 8,80$ pg; $p=0,075$).

PGE2 (pg)				
	1º trimestre n=23	2º trimestre n=23	3º trimestre n=23	Post-parto n=14
media (DE)	19,85 (6,77)	19,46 (7,38)	21,41 (10,41)	20,71 (8,80)
p^a		1,000	0,162	0,075

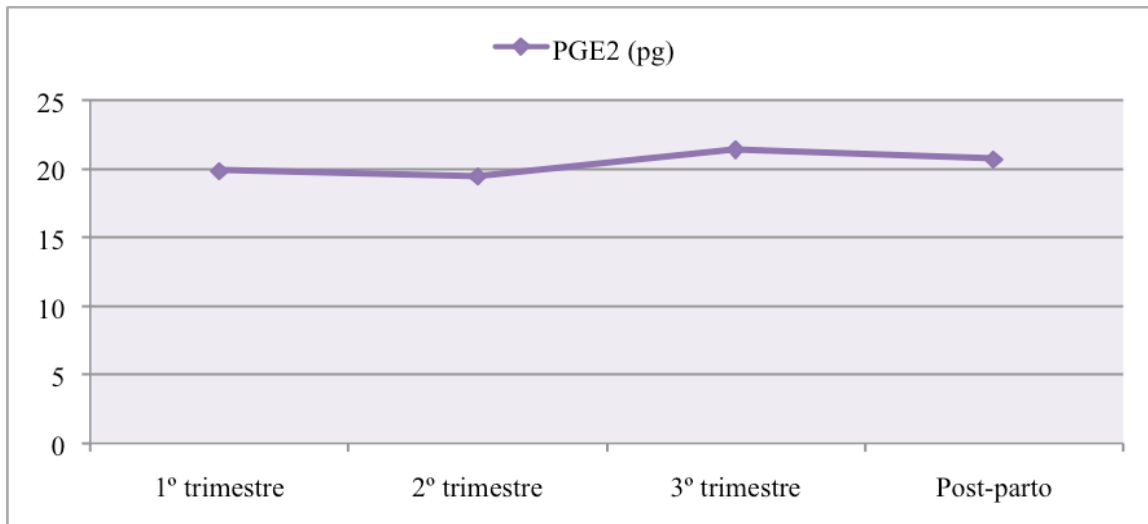


Tabla 26 y Figura 50: Evolución de la cantidad de PGE2 en FCG a lo largo del embarazo y tres meses tras el parto.

Test de Friedman con correcciones de Bonferroni. Significación al comparar cada periodo con el inmediatamente anterior.

Debido a razones técnicas sólo pudieron analizarse los resultados correspondientes a 23 embarazadas y a 14 tras el parto.

Concentración de prostaglandina E2 (PGE2)

- De forma global, la concentración de PGE2 no presentó diferencias ES a lo largo del embarazo ($p=0,433$).
- En el primer trimestre la concentración de PGE2 en FCG fue de $67,32 \pm 35,75$ ng/ml.
- En el segundo, la concentración de PGE2 se mantuvo en niveles similares a los del trimestre anterior ($68,75 \pm 30,89$ ng/ml; $p=0,282$).
- En el tercer trimestre, la concentración de PGE2 aumentó de forma no ES alcanzando un valor de $69,56 \pm 31,62$ ng/ml ($p=0,099$).
- Tres meses tras el parto, la concentración de PGE2 se redujo hasta $50,36 \pm 23,06$ ng/ml ($p=0,018$).

PGE2 (ng/ml)				
	1º trimestre n=23	2º trimestre n=23	3º trimestre n=23	Post-parto n=14
media (DE)	67,32 (35,78)	68,75 (30,89)	69,56 (31,62)	50,36 (23,06)
p^a		0,282	0,099	0,018

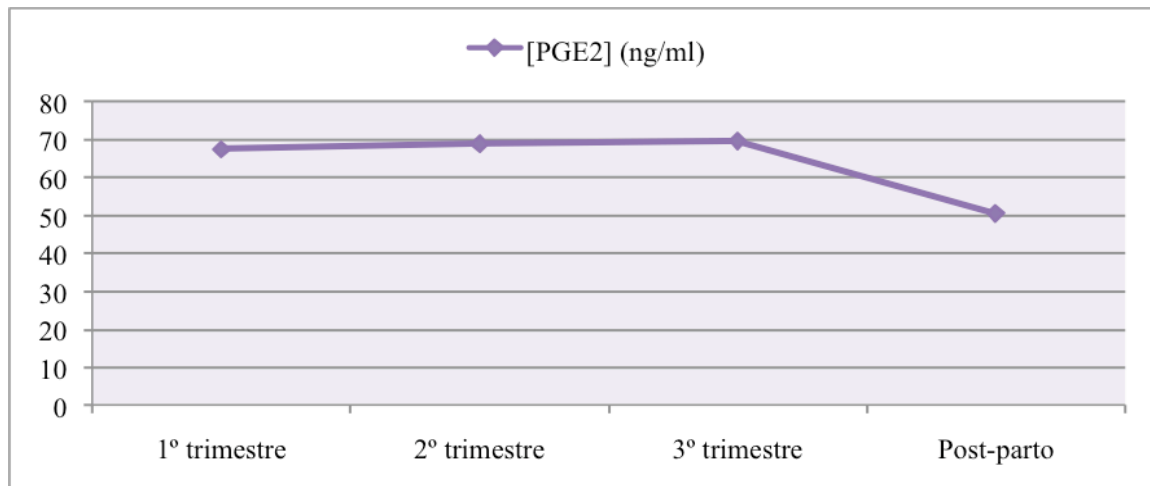


Tabla 27 y Figura 51: Evolución de la concentración de PGE2 en FCG a lo largo del embarazo y tres meses tras el parto.

^a Test de Friedman con correcciones de Bonferroni. Significación al comparar cada periodo con el inmediatamente anterior

Alta y baja reactividad frente a la placa

- No se encontraron diferencias ES entre los grupos con alta y baja reactividad frente a la placa en función de los niveles de PGE2 en FCG en ninguno de los periodos analizados.

PGE2					
	Baja reactividad		Alta reactividad		Valor de p ^b
	n	Media (SD)	n	Media (SD)	
Cantidad (pg)					
1° trimestre	12	20,24 (6,00)	11	19,27 (8,10)	0.698
2° trimestre	12	20,62 (7,55)	11	17,61 (6,19)	0.262
3° trimestre	12	28,12 (31,28)	11	18,6 (6,21)	0.757
Post-parto	7	17,15 (7,90)	7	18,94 (7,73)	0.586
Concentración (ng/ml)					
1° trimestre	12	70,26 (39,89)	11	60,41 (29,18)	0.558
2° trimestre	12	72,39 (30,96)	11	51,46 (27,31)	0.083
3° trimestre	12	81,75 (55,29)	11	64,66 (30,84)	0.339
Post-parto	7	50,34 (22,41)* ^a	7	65,41 (41,36)	0.517

Tabla 28: Niveles de PGE2 en los grupos con alta y baja reactividad.

^a Test de Friedman con correcciones de Bonferroni. Significación al comparar cada periodo con el inmediatamente anterior. *:p<0,05.

^b Test de Mann-Whitney. Comparación entre los grupos con alta y baja reactividad en cada periodo de estudio.

2.4. Correlaciones

2.4.1. Variables clínicas

- Se observa una correlación ES entre el incremento del índice gingival y el incremento en el índice de placa entre el primer y el segundo trimestre del embarazo ($p=0,004$, $r=0,433$). El resto de los cambios experimentados por el índice gingival, no están correlacionados de forma ES con los incrementos en el índice de placa.

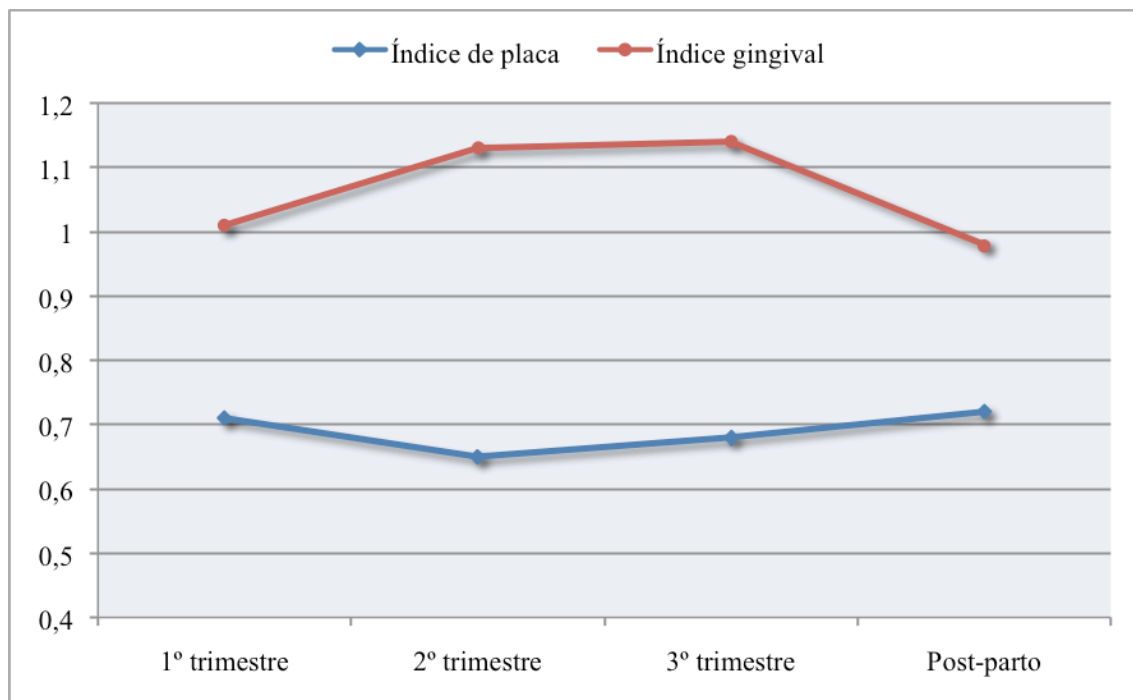


Figura 52: Evolución del IP y del IG a lo largo del estudio.

- Considerando de forma aislada los dientes anteriores y posteriores, sólo se encuentran correlaciones ES entre los incrementos en el índice de placa y el índice gingival en los dientes posteriores entre primer y segundo trimestre ($p=0,011$; $r=0,387$). El incremento experimentado por el índice gingival de los dientes anteriores a lo largo del embarazo, no está correlacionado con el incremento en los valores del índice de placa.
- En cuanto a las caras interproximales y las libres, sólo existe correlación ES para las caras interproximales entre primer y segundo trimestre ($p<0,001$; $r=0,551$). Los cambios experimentados en el índice gingival de las caras libres, no está correlacionado de forma ES con cambios en los niveles del índice de placa.

- Considerando los valores en forma de porcentajes, existe una correlación ES entre el incremento en el porcentaje de localizaciones con inflamación o sangrado entre el primer y el segundo trimestre y el incremento en el porcentaje de localizaciones con placa ($p=0,010$; $r=0,392$ para el porcentaje de localizaciones con inflamación; y $p=0,004$; $r=0,445$, para el porcentaje de localizaciones con sangrado).

Incrementos	1°-2° trimestre n=42	2°-3 trimestre n=42	3° trimestre- postparto n=26
IP e IG (Toda la boca)	<i>0,004 (0,433)</i>	0,675	0,305
IP e IG (Anteriores)	0,114	0,872	0,173
IP e IG (Posteriores)	<i>0,011 (0,387)</i>	0,404	0,912
IP e IG (Proximales)	<i><0,001 (0,551)</i>	0,653	0,096
IP e IG (Libres)	0,134	0,616	0,637
Inflamación y placa (%)	<i>0,010 (0,392)</i>	0,203	0,530
Sangrado y placa (%)	<i>0,004 (0,445)</i>	0,355	0,219

Tabla 23: Correlación entre el incremento en los valores del IP y del IG entre las visitas del estudio, considerando toda la boca de forma global y de forma aislada los dientes anteriores o posteriores y las caras interproximales o libres.

^a: Coeficiente de correlación de Pearson: significación (coeficiente).

2.4.2. Variables clínicas y hormonales

- No existe ninguna correlación ES entre el incremento en los niveles de hormonas en saliva y el incremento en el índice gingival a lo largo del embarazo; ni entre la reducción en los niveles hormonales y la reducción en el índice gingival tras el parto.

IG		General	Anterior	Posterior
1°-2° T	Progesterona	0,331	0,305	0,484
	Estradiol	0,507	0,973	0,276
2°-3° T	Progesterona	0,669	0,399	0,958
	Estradiol	0,356	0,712	0,232
3° T-PP	Progesterona	0,731	0,738	0,808
	Estradiol	0,425	0,650	0,278

Tabla 24: Correlaciones entre el incremento en los niveles de progesterona y estradiol en saliva y el cambio en el IG de toda la boca, de dientes anteriores y de dientes posteriores.

Correlación de Pearson: significación.

Porcentajes y niveles hormonales

- No existe ninguna correlación ES entre el porcentaje de localizaciones con inflamación o con sangrado y los niveles de progesterona o estradiol en saliva.
- Tampoco existe ninguna correlación ES entre el incremento en el porcentaje de localizaciones con inflamación o con sangrado observado a lo largo del embarazo y el incremento en los niveles de progesterona o estradiol en saliva.

		Inflamación (%)	Sangrado (%)
1° T	Progesterona	0,196	0,297
	Estradiol	0,369	0,527
2° T	Progesterona	0,125	0,099
	Estradiol	0,076	0,051
3° T	Progesterona	0,652	0,558
	Estradiol	0,533	0,560
PP	Progesterona	0,148	0,241
	Estradiol	0,318	0,479

Tabla 25: Correlaciones entre los niveles de progesterona y estradiol en saliva y el porcentaje de localizaciones con inflamación o sangrado.
Correlación de Pearson: significación (p).

		Inflamación (%)	Sangrado (%)
1°-2° T	Progesterona	0,400	0,297
	Estradiol	0,676	0,221
2°-3° T	Progesterona	0,561	0,593
	Estradiol	0,326	0,293
3° T-PP	Progesterona	0,679	0,686
	Estradiol	0,482	0,629

Tabla 26: Correlaciones entre el incremento en los niveles de progesterona y estradiol y el porcentaje de localizaciones con inflamación o sangrado.
Correlación de Pearson: significación (p).

2.4.3. Variables inmunológicas y hormonales e inmunológicas

- Debido a que no se observan cambios significativos en los niveles de IL-1 β y PGE2 en FCG a lo largo del embarazo, no se pueden establecer correlaciones entre dichos supuestos cambios y los cambios en el grado de inflamación gingival ni en las concentraciones de hormonas en saliva durante ese periodo.
- La reducción de los niveles de IL-1 β (cantidad y concentración) y en la concentración de PGE2 observadas tres meses tras el parto, no resultan estar ES correlacionados con la reducción experimentada por el índice gingival ni por la concentración de progesterona o estradiol en saliva durante ese intervalo.

3. COMPARACIÓN ENTRE LOS GRUPOS.

3.1. Homogeneidad de los grupos de estudio

Edad

La edad media al inicio del estudio es de 30,15 años (rango: 20-35 años) y de 24,38 años (rango: 22-26 años) para el grupo embarazo y no embarazo, respectivamente, siendo la diferencia entre ambos estadísticamente significativa ($p=0,001$) (T-Student).

Origen de la población

El 63,2% del grupo mujeres embarazadas son de nacionalidad española, frente al 96,2% del grupo de no embarazadas. En la figura 52 se puede observar la distribución de frecuencias en función de la nacionalidad de ambos grupos de estudio. El análisis estadístico (χ^2 de Pearson) no encuentra diferencias ES entre ambos grupos ($p=0,375$).

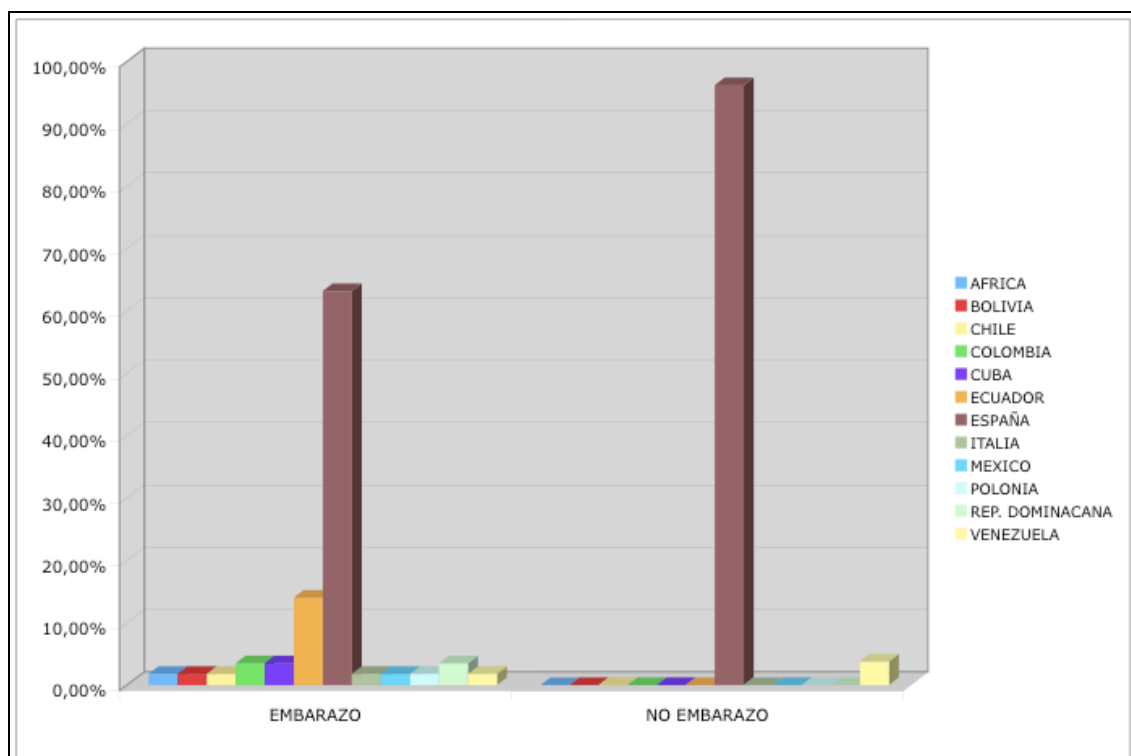


Figura 53: Distribución de los sujetos en función de su nacionalidad en ambos grupos de estudio.
Test estadístico: χ^2 de Pearson ($p=0,375$)

Profesión

En función de la profesión, las mujeres son clasificadas en funcionarias, empleadas, profesiones liberales, amas de casa y estudiantes.

En el grupo de embarazo, la mayor parte de las mujeres son empleadas (51,8%), seguidas de amas de casa (23,2%), profesiones liberales (16,1%) y funcionarias (8,9%). En este grupo, no hay ninguna estudiante.

En el grupo de no embarazadas, la profesión más frecuente es la liberal (61,5%), seguida de estudiantes (23,1%) y empleadas (15,4%). En este caso no hay funcionarias ni amas de casa.

El análisis estadístico encuentra diferencias ES entre ambos grupos ($p=0,001$).

Nivel de estudios

En cuanto al nivel de estudios, el 40,7% de las embarazadas tienen estudios universitarios, frente al 96,2% de las no embarazadas. El 3,8% restante del grupo de no embarazo posee estudios hasta la educación secundaria, frente al 50% del grupo de embarazo. Un 1,9% y un 7,4% de las embarazadas no poseen ningún tipo de estudios o poseen un nivel de educación primaria, respectivamente.

Las diferencias en el nivel de estudios entre ambos grupos son estadísticamente significativas ($p=0,001$).

Variables relacionadas con el estado de salud bucodental de las participantes.

El cuestionario realizado a las mujeres refleja que no existen diferencias estadísticamente significativas en el **tiempo transcurrido desde la última visita al odontólogo** entre ambos grupos ($p=0,254$). El 65,4% de las no embarazadas y el 47,4% de las embarazadas han ido al odontólogo hace menos de un año. El 23,1% y el 28,1% de las no embarazadas y embarazadas, respectivamente, ha ido hace más de un año; y el 11,5% y el 24,6% de las no embarazadas y embarazadas, respectivamente, ha ido hace 1 año (Figura 55).

En cambio, **la percepción individual del estado bucal** es estadísticamente diferente entre ambos grupos ($p=0,003$), con un 88,5% de las no embarazadas que consideran que su estado bucal es bueno, frente a un 7,7% que consideran que es regular y tan sólo un 3,8% que consideran que es malo.

En el grupo de embarazadas, un 49,1% considera que su estado bucal es bueno, seguido de un 40,4% que lo considera regular y un 10,5% que lo considera malo (Figura 56).

Por último, en cuanto a la **frecuencia de cepillado** no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p=0,315$), con un 76,9% de las no embarazadas y un 59,6% de las embarazadas que se cepillan al menos 3 veces al día. Un 23,1% y 31,6% de las no embarazadas y embarazadas, respectivamente, se cepillan 2 veces al día; y un 7% y un 1,8% de las embarazadas se cepillan 1 vez al día o de forma esporádica, respectivamente. Ninguna de las no embarazadas se encuentra en estos dos últimos grupos (Figura 57).

En general, se puede decir que ambos grupos son homogéneos en cuanto al origen geográfico, al momento de la última visita al odontólogo y a la frecuencia de cepillado. Sin embargo, el grupo embarazo posee mayor edad media, menor nivel de estudios, la mayor parte son empleadas y la percepción de su estado bucal está repartido entre bueno y regular. Frente al grupo de no embarazadas, que son más jóvenes, tienen un mayor nivel de estudios, se dedican sobre todo a profesiones liberales y la percepción de su estado bucal tiende a ser bueno.

	Embarazo	No embarazo	p
Edad (años)	30,15 (20-35)	24,38 (22-26)	<0.001 ^a
Nivel de estudios:			<0.001 ^b
Ninguno	1,9 %	0 %	
Primaria	7,4 %	0 %	
Secundaria	50,0 %	3,8 %	
Universidad	40,7 %	96,2 %	
Profesión:			<0.001 ^b
Empleada	60,7 %	15,5 %	
Profesión liberal	16,1 %	61,5 %	
Ama de casa	23,2 %	0 %	
Estudiante	0 %	23,1 %	
Frecuencia de cepillado dental:			0,315 ^b
3 veces/día	59,6 %	76,9 %	
2 veces/día	31,6 %	23,2 %	
1 vez/día	7 %	0 %	
Esporádicamente	1,8 %	0 %	
Última visita al odontólogo:			0,254 ^b
< 1 año	23,1 %	28,1 %	
1 año	65,4 %	47,4 %	
> 1 año	11,5 %	24,6 %	
Percepción del estado de salud bucal:			<0.001 ^b
Malo	10,5 %	3,8 %	
Regular	40,4 %	7,7 %	
Bueno	49,1 %	88,5 %	

Tabla 27: Características socio-demográficas de ambos grupos de estudio.

^a Test T-Student

^b Test de χ^2 de Pearson

3.2. Comparación embarazo y no embarazo:

3.2.1. Variables clínicas

3.2.1.1. Índice de placa

- No existe una interacción ES entre el tiempo y el grupo ($p=0,994$), es decir, el efecto del tiempo en el índice de placa fue similar en ambos grupos; sin embargo, sí que existen diferencias ES entre ambos grupos de forma global ($p=0,049$).
- En la primera visita, el valor del índice de placa de toda la boca para el grupo de embarazadas fue de $0,71\pm0,43$ y para el grupo de no embarazadas de $0,53\pm0,31$. La diferencia entre ambos grupos no fue ES ($p=0,114$).
- Seis meses después, el índice de placa de ambos grupos se mantuvo relativamente constante respecto a la visita inicial ($p=0,374$). El valor del índice de placa para el grupo de embarazadas en el tercer trimestre fue de $0,68\pm0,30$ y para el grupo de no embarazadas de $0,50\pm0,23$, siendo la diferencia entre ambos ES ($p=0,028$).

Presencia / ausencia de placa

- Si se transforman los valores del índice de placa en dicotómicos (presencia/ausencia), la interacción entre el tiempo y el grupo sigue sin ser ES ($p=0,567$) y la diferencia global entre los grupos desaparece ($p=0,129$).
- El porcentaje de localizaciones con placa en la primera visita para el grupo embarazo fue de $52,97\pm24,02\%$ y para el grupo de no embarazo de $46,28\pm21,91\%$, siendo la diferencia entre ambos no ES ($p=0,305$).
- En la visita correspondiente al tercer trimestre del embarazo, el porcentaje de localizaciones con placa en el grupo de embarazadas fue de $52,67\pm19,70\%$. En el grupo de no embarazadas fue de $43,07\pm16,30\%$. La diferencia entre ambos grupos no fue ES ($p=0,069$).

	Índice de placa		Índice de placa (%)	
	1º trimestre media (DE)	3º trimestre media (DE)	1º trimestre - media (DE)	3º trimestre - media (DE)
Embarazo (n=42)	0,71 (0,43)	0,68 (0,30)	52,97 (24,02)	52,67 (19,70)
No embarazo (n=20)	0,53 (0,31)	0,50 (0,23)	46,28 (21,91)	43,07 (16,30)
<i>p</i>^a	<i>0,114</i>	<i>0,028</i>	<i>0,305</i>	<i>0,069</i>

Tabla 28: Comparació del IP en valor absoluto y en porcentaje entre el grupo de mujeres embarazadas y no embarazadas, en las visitas correspondientes al primer y tercer trimestre del embarazo.

^aT-Student para muestras independientes.

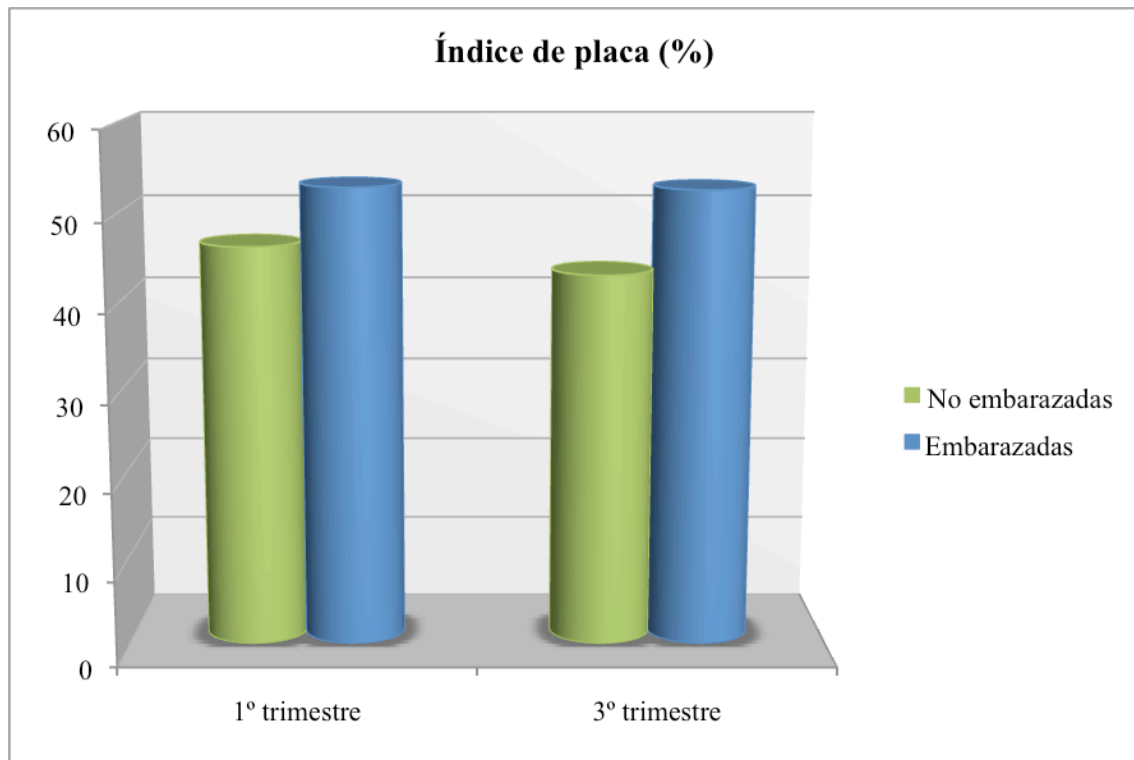


Figura 54: Comparación del porcentaje de localizaciones con placa entre el grupo de embarazadas y no embarazadas en el primer y el tercer trimestre del embarazo.

Dientes anteriores y dientes posteriores

- Ni en dientes anteriores ni en posteriores existe una interacción ES entre el tiempo y el grupo ($p=0,851$ y $p=0,903$, para anteriores y posteriores, respectivamente).
- En los dientes anteriores no existieron diferencias ES de forma global en función del grupo ($p=0,121$), sin embargo, las mujeres embarazadas tendieron a tener valores de índice de placa superiores a los de las no embarazadas ($p>0,05$).
- En los dientes posteriores, se produjo un efecto global del grupo ES ($p=0,024$). Tanto en el primer como en el tercer trimestre, los valores del índice de placa en los dientes posteriores fueron superiores de forma ES en el grupo embarazo frente al no embarazo ($p=0,038$ y $p=0,012$ para primer y tercer trimestre, respectivamente).

	Dientes anteriores		Dientes posteriores	
	1º trimestre media (DE)	3º trimestre media (DE)	1º trimestre - media (DE)	3º trimestre - media (DE)
Embarazo (n=42)	0,66 (0,46)	0,61 (0,35)	0,75 (0,43)	0,73 (0,29)
No embarazo (n=20)	0,50 (0,43)	0,46 (0,26)	0,56 (0,26)	0,54 (0,25)
p^a	<i>0,186</i>	<i>0,097</i>	<i>0,038</i>	<i>0,012</i>

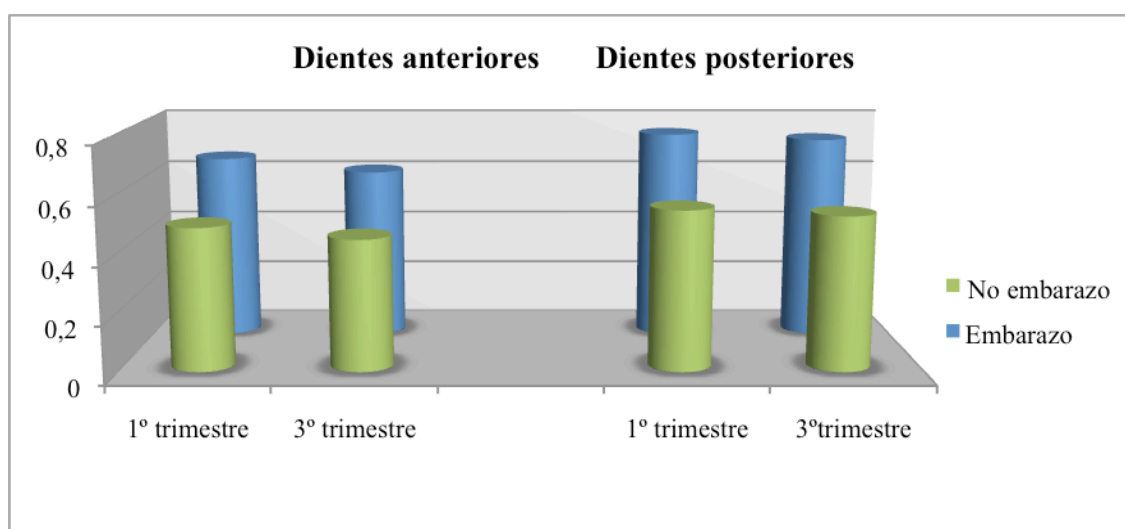


Tabla 29 y Figura 55: Comparación del IP en dientes anteriores y posteriores entre el grupo de mujeres embarazadas y no embarazadas.

^a T-Student para muestras independientes.

Caras interproximales y caras libres

- Ni en caras interproximales ni en caras libres existió una interacción ES entre el tiempo y el grupo ($p=0,903$).
- En las caras interproximales no se produjeron diferencias ES de forma global en función del grupo ($p=0,127$), aunque el grupo embarazo tendió a tener valores de índice de placa superiores a los del grupo no embarazo ($p>0,05$).
- En las caras libres se produjo un efecto global del grupo ES ($p=0,024$). Tanto en el primer como en el tercer trimestre, los valores del índice de placa en los caras libres fueron significativamente superiores en el grupo embarazo frente al no embarazo, aunque la diferencia sólo fue ES en el tercer trimestre ($p=0,017$).

	Caras interproximales		Caras libres	
	1º trimestre media (DE)	3º trimestre media (DE)	1º trimestre - media (DE)	3º trimestre - media (DE)
Embarazo (n=42)	0,63 (0,43)	0,59 (0,30)	0,79 (0,44)	0,76 (0,33)
No embarazo (n=20)	0,50 (0,30)	0,45 (0,24)	0,57 (0,33)	0,55 (0,25)
<i>p^a</i>	<i>0,248</i>	<i>0,081</i>	<i>0,055</i>	<i>0,017</i>

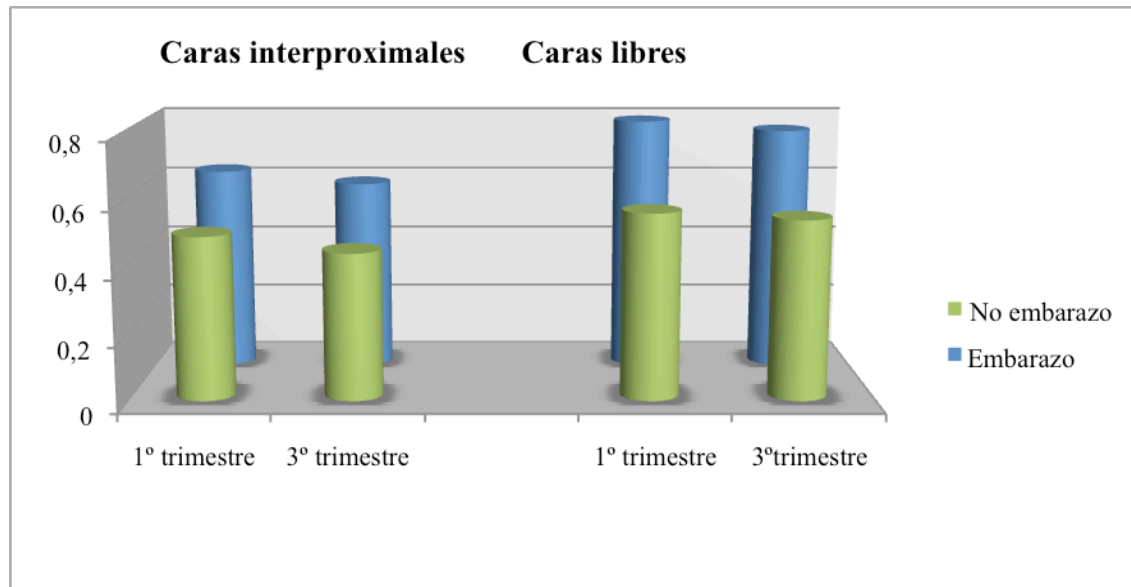


Tabla 30 y Figura 56: Comparación del IP en caras interproximales y libres entre el grupo de mujeres embarazadas y no embarazadas en las visitas correspondientes al primer y tercer trimestre del embarazo.

^aT-Student para muestras independientes.

3.2.1.2. Índice gingival.

- Existe una interacción ES entre el tiempo y el grupo ($p=0,045$), lo que implica que el efecto del tiempo en el índice gingival es diferente en ambos grupos de estudio:
 - En el grupo de embarazadas el índice gingival se incrementó de forma ES entre el primer y el tercer trimestre ($p=0,025$).
 - En el grupo de no embarazadas el índice gingival no experimentó cambios ES a lo largo del periodo de observación (0,383).
- En la primera visita, el valor del índice gingival de toda la boca para el grupo de embarazadas fue de $1,01 \pm 0,42$ y para el grupo de no embarazadas de $0,65 \pm 0,44$. La diferencia entre ambos grupos fue ES ($p=0,005$).
- Seis meses después, el índice gingival para el grupo de embarazadas fue de $1,14 \pm 0,44$ y para el grupo de no embarazadas de $0,58 \pm 0,28$, siendo la diferencia entre ambos ES ($p<0,001$).

Índice gingival		
	1º trimestre - media (DE)	3º trimestre- media (DE)
Embarazo (n=42)	1,01 (0,42)	1,14 (0,44)
No embarazo (n=20)	0,65 (0,44)	0,58 (0,28)
p^a	0,005	<0,001

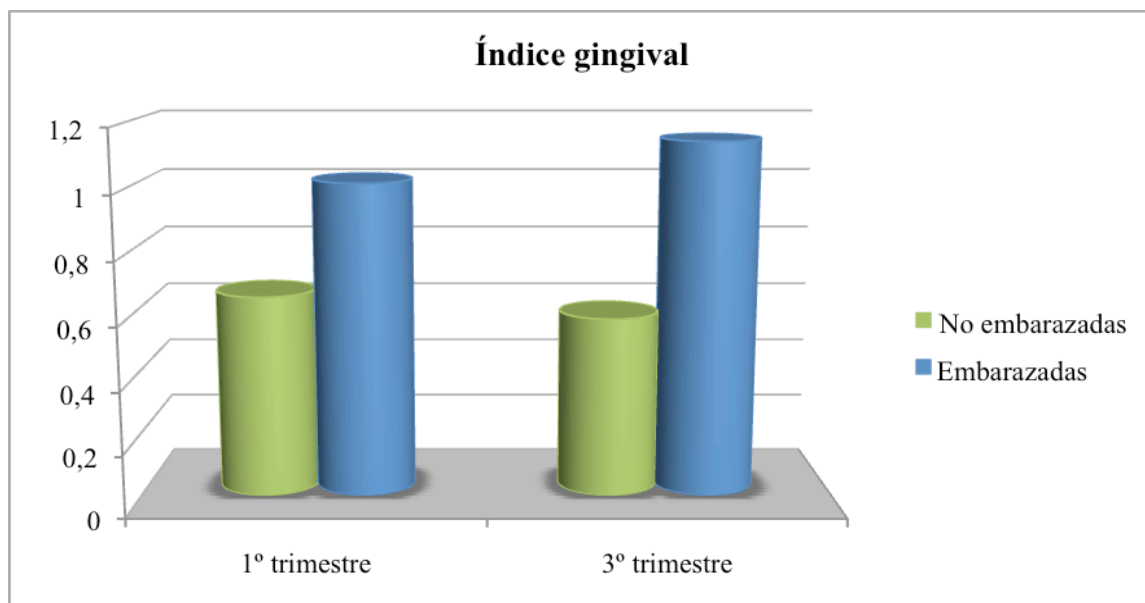


Tabla 31 y Figura 57: Comparación del IG entre el grupo de mujeres embarazadas y no embarazadas en las visitas correspondientes al primer y tercer trimestre del embarazo.

^aT-Student para muestras independientes.

Inflamación (localizaciones con índice gingival 1, 2 o 3)

- El porcentaje de localizaciones con inflamación no presentó una interacción ES entre el tiempo y el grupo ($p=0,097$), es decir, el tiempo afectó de la misma forma a ambos grupos de estudio.
- El efecto del grupo fue ES ($p<0,001$), de tal forma, que tanto en el primer como en el tercer trimestre, el porcentaje de localizaciones con inflamación fue significativamente superior en el grupo de embarazadas que en el de no embarazadas ($p=0,002$ y $p<0,001$, para primer y tercer trimestre, respectivamente).

Sangrado (localizaciones con índice gingival 2 o 3)

- El porcentaje de localizaciones con sangrado presentó una interacción ES entre el tiempo y el grupo ($p=0,043$), de tal forma que el factor tiempo afectó de forma diferente a ambos grupos:
 - En el grupo embarazo se produjo un incremento ES en el porcentaje de localizaciones con sangrado ($p=0,024$).
 - En el grupo de no embarazadas, el porcentaje de localizaciones con sangrado no experimentó cambios ES ($p=0,368$).
- Tanto en el primer como en el tercer trimestre el grupo embarazo tuvo un mayor porcentaje de localizaciones con sangrado ($p=0,003$ y $p<0,001$, respectivamente).

	Inflamación (%)		Sangrado (%)	
	1° trimestre media (DE)	3° trimestre media (DE)	1° trimestre - media (DE)	3° trimestre - media (DE)
Embarazo (n=42)	51,44 (20,18)	56,44 (20,97)	46,46 (17,96)	51,60 (19,33)
No embarazo (n=20)	32,97 (21,03)	29,89 (14,42)	31,01 (19,77)	27,71 (13,37)
p^a	0,002	<0,001	0,003	<0,001

Tabla 32: Comparación del porcentaje de localizaciones con inflamación o con sangrado entre el grupo de mujeres embarazadas y no embarazadas, en las visitas correspondientes al primer y tercer trimestre del embarazo.

^a T-Student para muestras independientes.

Dientes anteriores y posteriores

- En los dientes anteriores se produjo una interacción ES entre el tiempo y el grupo ($p=0,003$), lo que implica que en este sector, el índice gingival se comportó diferente entre ambos grupos:
 - En el grupo de embarazadas se produjo un incremento ES en el índice gingival ($p=0,007$).
 - En el grupo de no embarazadas, el índice gingival sufrió una reducción no ES ($p=0,093$).
- En los dientes posteriores no existió una interacción ES entre el tiempo y el grupo ($p=0,403$), lo que implica que el efecto del tiempo es el mismo en ambos grupos, sin cambios ES en ninguno de ellos ($p=0,354$).
- Tanto en dientes anteriores como en posteriores el índice gingival fue significativamente superior en el grupo de embarazadas que en el de no embarazadas ($p=0,031$ en el primer trimestre de dientes anteriores y $p<0,001$ para el resto).

	Dientes anteriores		Dientes posteriores	
	1º trimestre media (DE)	3º trimestre media (DE)	1º trimestre - media (DE)	3º trimestre - media (DE)
Embarazo (n=42)	0,95 (0,50)	1,10 (0,54)	1,06 (0,40)	1,16 (0,43)
No embarazo (n=20)	0,64 (0,47)	0,47 (0,30)	0,65 (0,43)	0,66 (0,29)
p^a	0,031	<0,001	<0,001	<0,001

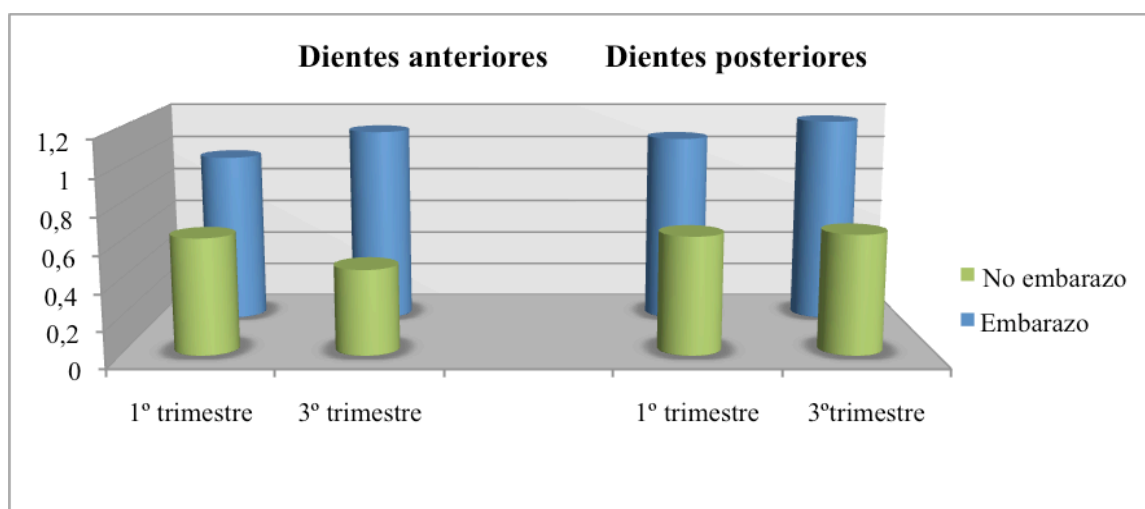


Tabla 33 y Figura 58: Comparación del IG en dientes anteriores y posteriores entre las mujeres embarazadas y no embarazadas en las visitas correspondientes al primer y tercer trimestre del embarazo.
^a T-Student para muestras independientes.

Caras interproximales y caras libres

- El índice gingival a nivel de las caras interproximales no presentó una interacción ES entre el tiempo y el grupo ($p=0,085$), lo que implica que el tiempo afectó igual a ambos grupos ($p=0,473$).
- El índice gingival a nivel de las caras libres sí presentó una interacción ES entre el tiempo y el grupo, lo que implica que el tiempo no afectó igual a ambos grupos:
 - En el grupo embarazo se produjo un incremento ES ($p=0,030$).
 - En el grupo no embarazo se produjo una reducción no ES ($p=0,263$).
- Tanto en las caras interproximales como en las libres, el índice gingival en las mujeres embarazadas fue significativamente superior que en las no embarazadas ($p<0,05$ y $p<0,001$ en primer y tercer trimestre, respectivamente).

Índice gingival				
	Caras interproximales		Caras libres	
	1º trimestre media (DE)	3º trimestre media (DE)	1º trimestre - media (DE)	3º trimestre - media (DE)
Embarazo (n=42)	0,90 (0,47)	1,05 (0,48)	1,12 (0,40)	1,23 (0,44)
No embarazo (n=20)	0,56 (0,48)	0,50 (0,35)	0,74 (0,43)	0,65 (0,28)
<i>p^a</i>	<i>0,011</i>	<i><0,001</i>	<i>0,002</i>	<i><0,001</i>

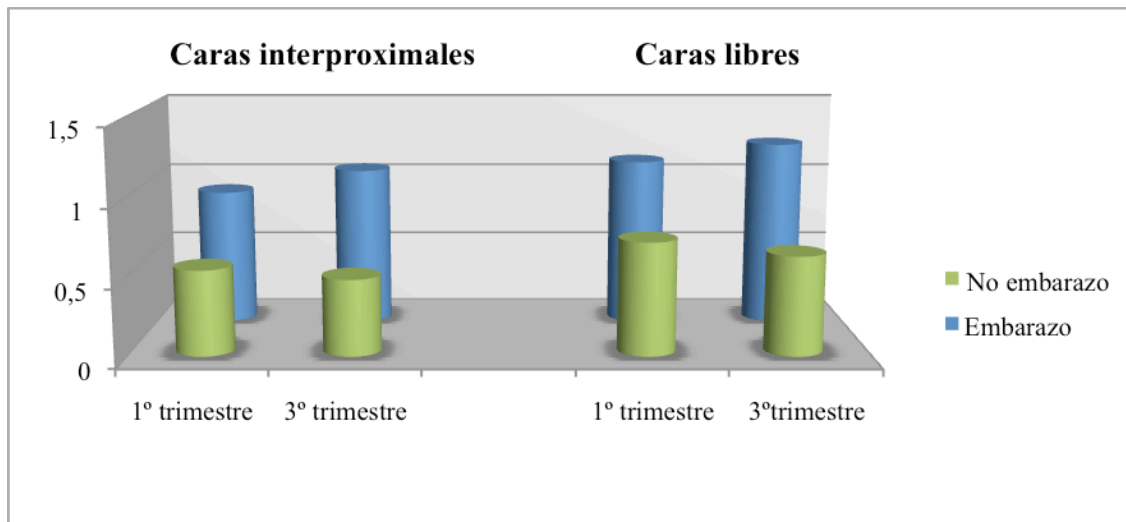


Tabla 34 y Figura 59: Comparación del IG en caras interproximales y libres entre el grupo de mujeres embarazadas y no embarazadas, en las visitas correspondientes al primer y tercer trimestre del embarazo.

^aT-Student para muestras independientes.

3.2.1.3. Reacción inflamatoria a la placa (IG/IP)

- La reacción inflamatoria a la placa no presentó una interacción ES entre el tiempo y el grupo ($p=0,319$), lo que implica que el tiempo se comportó igual en ambos grupos ($p=0,927$).
- En la primera visita, el valor de IG/IP en el grupo de embarazadas fue de $1,70\pm0,86$ y en el grupo de no embarazadas de $1,35\pm0,76$, siendo la diferencia entre ambos grupo no ES ($p=0,132$).
- Seis meses después, el valor de IG/IP en el grupo de embarazadas aumentó de forma no ES hasta $1,85\pm0,78$ y en el grupo de no embarazadas se redujo de forma no significativa hasta $1,23\pm0,54$ ($p=0,576$), siendo la diferencia entre ambos grupos ES ($p=0,003$).

IG/IP		
	1° trimestre - media (DE)	3° trimestre- media (DE)
Embarazo (n=42)	1,70 (0,86)	1,85 (0,78)
No embarazo (n=20)	1,35 (0,76)	1,23 (0,54)
<i>p^a</i>	0,132	0,003

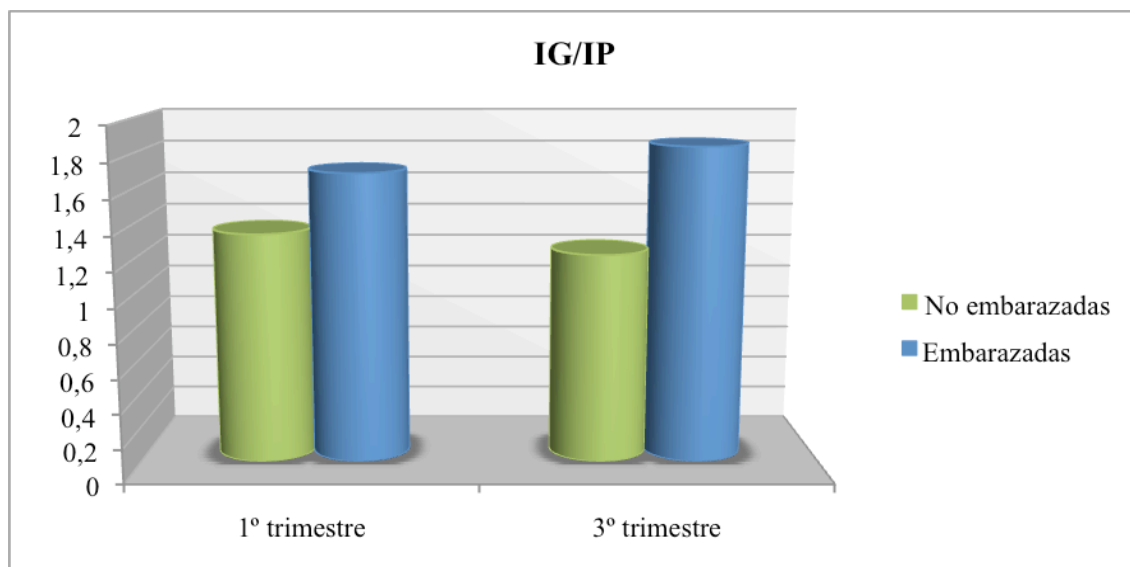


Tabla 35 y Figura 60: Comparación del valor de IG/IP entre el grupo de mujeres embarazadas y no embarazadas, en las visitas correspondientes al primer y tercer trimestre del embarazo.

^a Test de Mann-Whitney.

Dientes anteriores y dientes posteriores

- La reacción inflamatoria a la placa (IG/IP) no presentó una interacción ES entre el tiempo y el grupo para ninguno de los dos tipos de dientes ($p=0,129$ para dientes anteriores y $p=0,838$ para dientes posteriores), lo que implica que el tiempo afectó igual a ambos grupos.
- En los dientes anteriores el efecto del grupo tampoco fue ES ($p=0,279$), de tal modo que no existieron diferencias ES entre IG/IP en los dientes anteriores del grupo de mujeres embarazadas y no embarazadas.
- En los dientes posteriores el efecto del grupo sí fue ES ($p=0,012$). Analizando de forma individual cada visita, se observa que la diferencia sólo fue ES en el primer trimestre del embarazo ($p=0,044$).

	Dientes anteriores		Dientes posteriores	
	1º trimestre media (DE)	3º trimestre media (DE)	1º trimestre - media (DE)	3º trimestre - media (DE)
Embarazo (n=42)	2,09 (1,76)	2,94 (5,80)	1,67 (0,80)	1,72 (0,79)
No embarazo (n=20)	2,13 (2,33)	1,11 (0,57)	1,24 (0,68)	1,34 (0,67)
<i>p^a</i>	<i>0,941</i>	<i>0,176</i>	<i>0,044</i>	<i>0,075</i>

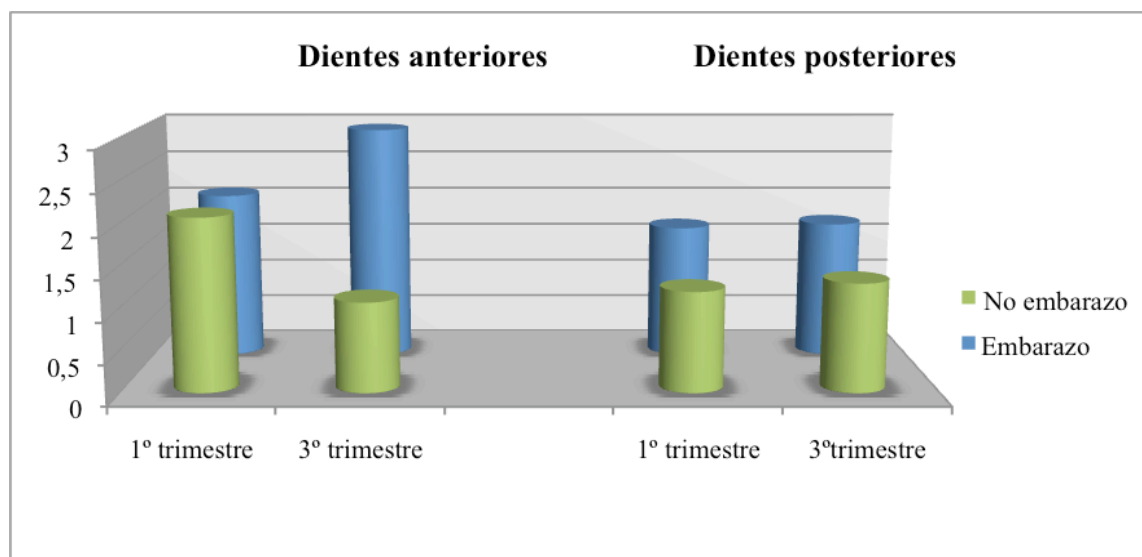


Tabla 36 y Figura 61: Comparación de IG/IP en dientes anteriores y posteriores entre el grupo de mujeres embarazadas y no embarazadas, en las visitas correspondientes al primer y tercer trimestre del embarazo.

^a Test de Mann-Whitney.

Caras interproximales y caras libres

- La reacción inflamatoria a la placa (IG/IP) no presentó una interacción ES entre el tiempo y el grupo en las caras interproximales ni en las libres, lo que implica que el tiempo afectó igual a ambos grupos ($p=0,140$ para caras interproximales y $p=0,443$, para caras libres).
- En las caras interproximales el efecto global del grupo sí que fue ES ($p=0,002$), de tal modo que la reacción inflamatoria a la placa en esas localizaciones fue superior en mujeres embarazadas que no embarazadas, aunque la diferencia considerando cada visita de forma aislada sólo fue ES para el tercer trimestre ($p=0,153$ para primer trimestre y $p=0,001$, para tercer trimestre).
- En las caras libres el efecto global del grupo no fue ES aunque se encuentra cercano a la significación ($p=0,056$). En el primer trimestre del embarazo no existieron diferencias ES entre los grupos ($p=0,278$). En el tercer trimestre, las diferencias entre los grupos sí que fueron ES, con las mujeres embarazadas presentando valores de GI/PI superiores a los de las no embarazadas ($p=0,035$).

	Caras interproximales		Caras libres	
	1º trimestre media (DE)	3º trimestre media (DE)	1º trimestre - media (DE)	3º trimestre - media (DE)
Embarazo (n=42)	1,77 (0,99)	2,12 (1,23)	1,68 (0,86)	1,78 (0,76)
No embarazo (n=20)	1,35 (1,18)	1,12 (0,53)	1,43 (0,79)	1,33 (0,74)
p^a	0,153	0,001	0,278	0,035

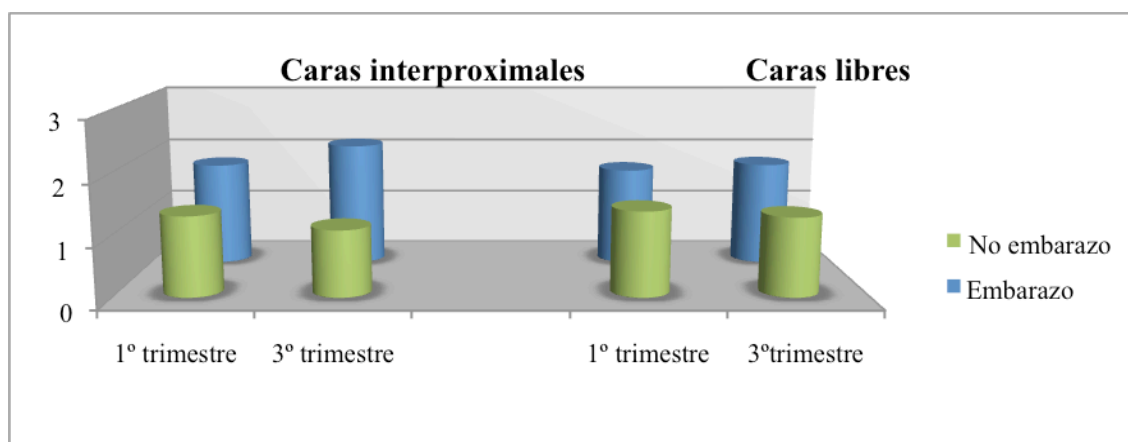


Tabla 37 y Figura 62: Comparación de IG/IP en caras interproximales y libres entre mujeres embarazadas y no embarazadas, en las visitas correspondientes al primer y tercer trimestre del embarazo.

^a Teste de Mann-Whitney.

Porcentajes

- La reacción inflamatoria a la placa en formato de porcentajes (porcentaje de localizaciones con inflamación o sangrado entre el porcentaje de localizaciones con placa) no presenta interacción ES entre el tiempo y el grupo ($p=0,403$ para inflamación/placa y $p=0,233$ para sangrado/placa).
- En ninguna de las dos variables existe un efecto ES a lo largo del tiempo ($p>0,05$), aunque el efecto del grupo es ES en ambos casos ($p<0,001$ para inflamación/placa y $p=0,001$ para sangrado/placa), con el grupo embarazo presentado valores significativamente superiores que el grupo no embarazo.

	Inflamación/ placa		Sangrado /placa	
	1º trimestre media (DE)	3º trimestre media (DE)	1º trimestre - media (DE)	3º trimestre - media (DE)
Embarazo (n=42)	1,08 (0,50)	1,14 (0,41)	0,98 (0,44)	1,06 (0,40)
No embarazo (n=19)	0,79 (0,46)	0,72 (0,30)	0,75 (0,46)	0,66 (0,28)
p^a	0,032	<0,001	0,068	<0,001

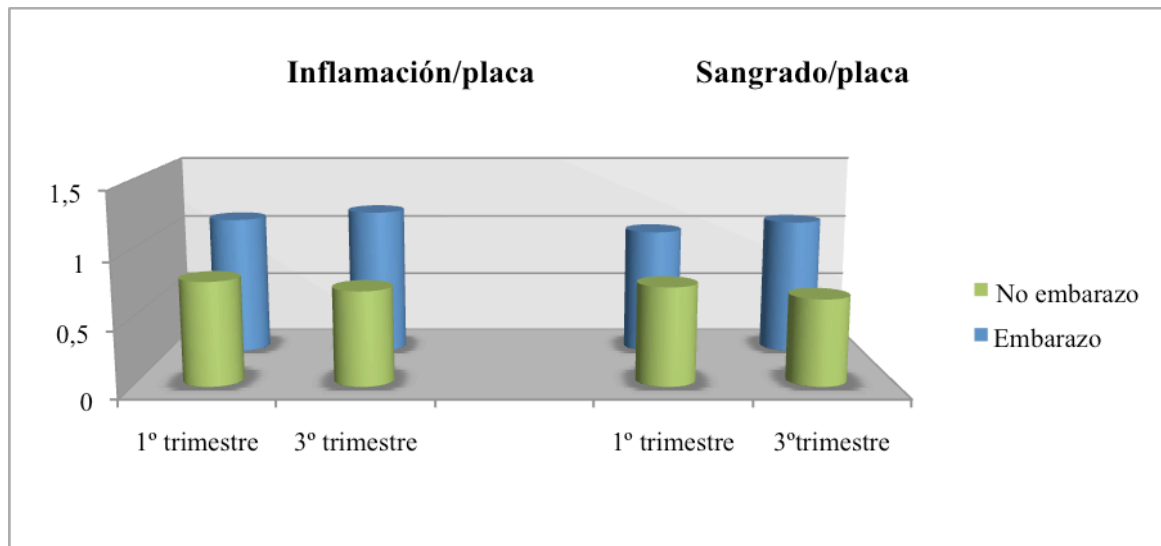


Tabla 38 y Figura 63: Comparación del porcentaje de localizaciones con inflamación o sangrado entre el porcentaje de localizaciones con placa entre el grupo de mujeres embarazadas y no embarazadas, en las visitas correspondientes al primer y tercer trimestre del embarazo.

^a T-Student para muestras independientes

3.2.2. Niveles de hormonas en saliva

Progesterona

- La concentración de progesterona en saliva presentó una interacción ES entre el tiempo y el grupo ($p<0,001$), de tal forma que el tiempo tuvo una influencia diferente en cada grupo.
- En la primera visita, correspondiente al primer trimestre del embarazo, la concentración de progesterona en saliva en el grupo de embarazadas fue de $249,75\pm196,03$ pg/ml y en el grupo de no embarazadas de $20,63\pm30,12$ pg/ml. La diferencia entre ambos grupos fue ES ($p<0,001$).
- Seis meses después, el grupo de embarazadas experimentó un incremento ES en la concentración de progesterona en saliva ($p<0,001$), que alcanzó un valor medio de $1543,10\pm760,38$ pg/ml. El grupo de no embarazadas no experimentó cambios ES en la concentración de progesterona ($p=0,344$). En esta visita, ambos grupos presentaron diferencias ES ($p<0,001$).

Progesterona (pg/ml)		
	1° trimestre - media (DE)	3° trimestre- media (DE)
Embarazo (n=42)	249,75 (196,03)	1543,10 (760,38)
No embarazo (n=20)	20,63 (30,12)	40,03 (91,12)
<i>p^a</i>	<i><0,001</i>	<i><0,001</i>

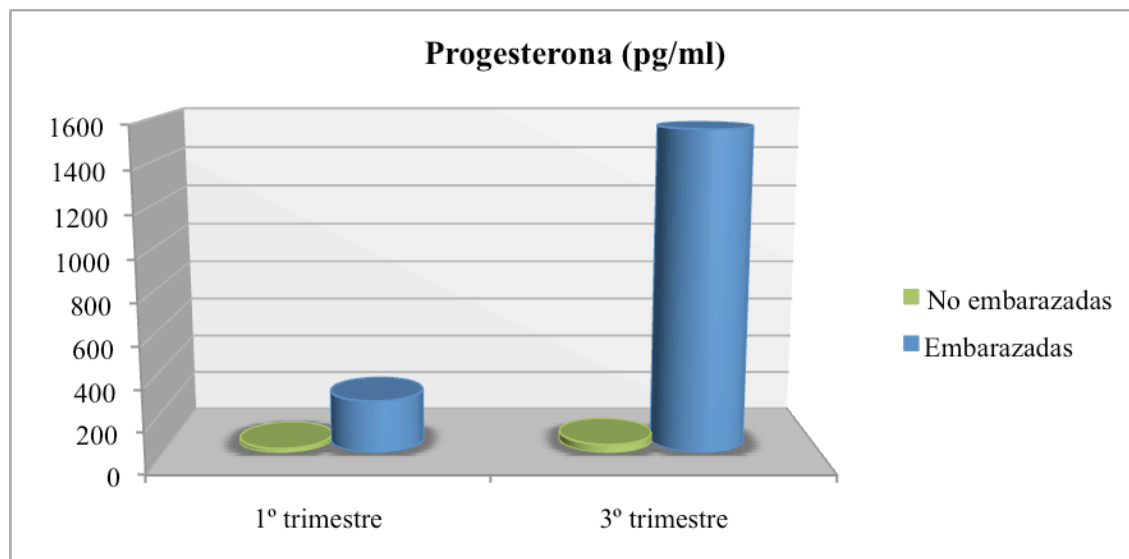


Tabla 39 y Figura 64: Comparación de la concentración de progesterona en saliva entre el grupo de mujeres embarazadas y no embarazadas, en las visitas correspondientes al primer y tercer trimestre del embarazo. ^a Test de Mann Whitney.

Estradiol

- La concentración de estradiol en saliva presentó una interacción ES entre el tiempo y el grupo ($p=0,002$), de tal forma que el tiempo tuvo una influencia diferente en cada grupo.
- En la primera visita, correspondiente al primer trimestre del embarazo, la concentración de estradiol en saliva en el grupo de embarazadas fue de $0,93\pm 2,56$ pg/ml y en el grupo de no embarazadas de $0,01\pm 0,06$ pg/ml. La diferencia entre ambos grupos fue ES ($p=0,024$).
- Seis meses después, el grupo de embarazadas experimentó un incremento ES en la concentración de estradiol en saliva ($p<0,001$), que alcanzó un valor medio de $24,38\pm 32,12$ pg/ml. El grupo de no embarazadas no experimentó cambios ES en la concentración de estradiol ($p=0,763$). En esta visita, ambos grupos presentaron diferencias ES ($p<0,001$).

Estradiol (pg/ml)		
	1º trimestre - media (DE)	3º trimestre- media (DE)
Embarazo (n=42)	0,93 (2,56)	24,38 (32,12)
No embarazo (n=20)	0,01 (0,06)	0,01 (0,04)
p^a	0,024	<0,001

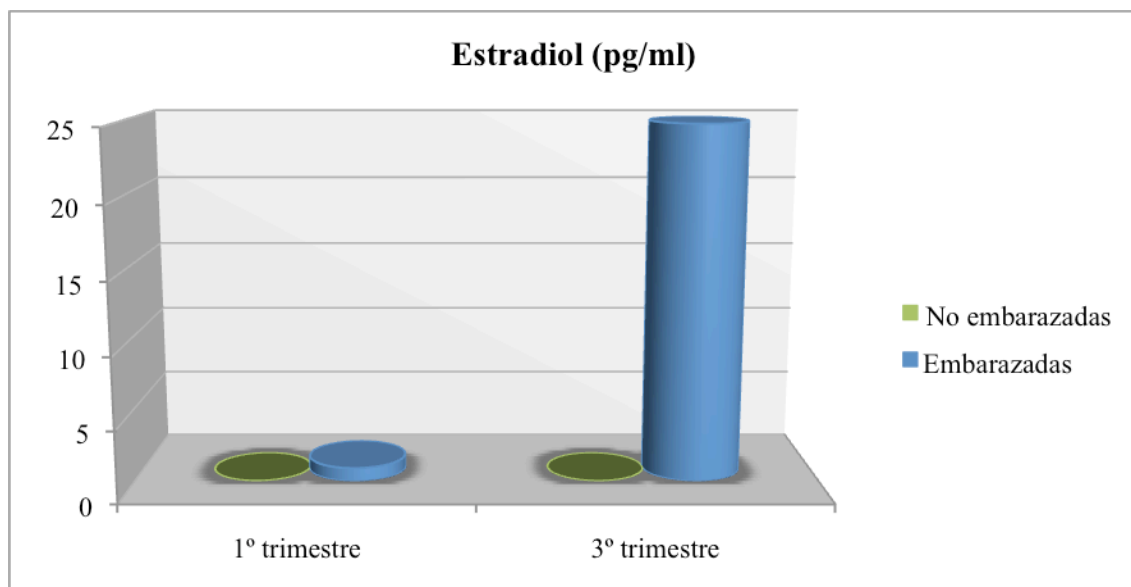


Tabla 40 y Figura 65: Comparación de la concentración de estradiol en saliva entre mujeres embarazadas y no embarazadas, en las visitas correspondientes al primer y tercer trimestre del embarazo.

^a Test de Mann-Whitney.

3.2.3. Variables bioquímicas en FCG

3.2.3.1. Interleuquina 1 β

- Ni la cantidad ni la concentración de IL-1 β presentaron una interacción ES entre el tiempo y el grupo ($p=0,785$ y $p=0,371$, para cantidad y concentración, respectivamente). El efecto del tiempo no fue ES para ninguno de los dos parámetros ($p=0,269$ y $p=0,231$ para cantidad y concentración, respectivamente).
- En la primera visita, la cantidad de IL-1 β en FCG en el grupo de embarazadas fue de $30,05 \pm 27,05$ pg y en el grupo de no embarazadas de $3,71 \pm 3,25$ pg, siendo la diferencia entre ambos ES ($p < 0,001$). Seis meses después, la cantidad de IL-1 β en FCG no ha experimentado cambios ES en ninguno de los dos grupos ($p=0,269$), por lo que la diferencia entre ambos grupos continúa siendo ES ($p < 0,001$).
- En cuanto a la concentración de IL-1 β en FCG, en la primera visita fue de $73,12 \pm 57,93$ ng/ml en el grupo de embarazadas y $14,56 \pm 17,29$ ng/ml en el grupo de no embarazadas. La diferencia entre ambos grupos fue ES ($p < 0,001$). Seis meses después, las diferencias entre ambos grupos continúan siendo ES ($p < 0,001$).

	Cantidad (pg)		Concentración (ng/ml)	
	1º trimestre media (DE)	3º trimestre media (DE)	1º trimestre - media (DE)	3º trimestre - media (DE)
Embarazo (n=42)	30,05 (27,05)	30,45 (24,61)	73,12 (57,93)	85,27 (69,66)
No embarazo (n=19)	3,66 (3,39)	4,54 (5,90)	14,00 (18,13)	12,00 (10,69)
p^a	<i><0,001</i>	<i><0,001</i>	<i><0,001</i>	<i><0,001</i>

Tabla 47: Comparación de la cantidad y concentración de IL-1 β en FCG entre el grupo de mujeres embarazadas y no embarazadas, en las visitas correspondientes al primer y tercer trimestre del embarazo.

^a Test de Mann-Whitney.

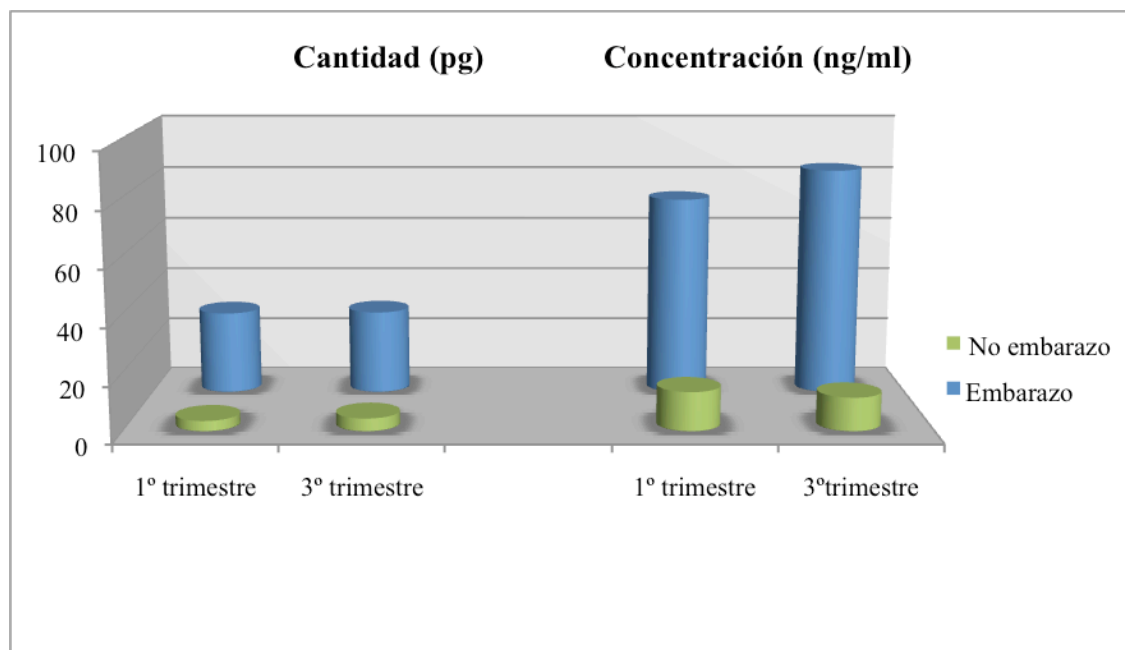


Figura 66: Comparación de la cantidad y concentración de IL-1 β en FCG entre el grupo de mujeres embarazadas y no embarazadas, en las visitas correspondientes al primer y tercer trimestre del embarazo.

3.2.3.2. Prostaglandina E2.

Debido a problemas técnicos con uno de los kits de PGE2 sólo se pudieron analizar 23 muestras de embarazadas en la tercera visita y diez muestras de no embarazadas en la segunda visita, por lo que los datos de la comparativa de este apartado se refieren a ese número de pacientes.

- Ni la cantidad ni la concentración de PGE2 presentaron una interacción ES entre el tiempo y el grupo ($p=0,314$ y $p=0,771$ para cantidad y concentración, respectivamente), lo que implica que el tiempo se comportó de la misma forma en ambos grupos.
- El efecto del tiempo no fue ES en ninguno de los dos grupos ($p=0,563$ y $p=0,784$, para cantidad y concentración, respectivamente).
- En la primera visita, la cantidad de PGE2 en FCG en el grupo de mujeres embarazadas fue de $19,85 \pm 6,77$ pg y en el grupo de no embarazadas de $21,88 \pm 13,88$ pg, siendo la diferencia entre ambos grupos no ES ($p=0,168$). Seis meses después la cantidad de PGE2 no experimentó cambios ES en ninguno de los dos grupos, por lo que la diferencia entre ambos continúa siendo no ES ($p=0,878$).
- En cuanto a la concentración de PGE2, en la primera visita fue de $67,32 \pm 35,78$ ng/ml en el grupo de mujeres embarazadas y de $80,39 \pm 69,17$ ng/ml en el de no embarazadas, siendo la diferencia entre ambos no ES ($p=0,865$). Seis meses después no se produjeron cambios ES en ninguno de los grupos, por lo que la diferencia entre ambos sigue siendo no ES ($p<0,180$).

PGE2				
	Cantidad (pg)		Concentración (ng/ml)	
	1º trimestre media (DE)	3º trimestre media (DE)	1º trimestre - media (DE)	3º trimestre - media (DE)
Embarazo (n=23)	19,85 (6,77)	21,41 (10,41)	67,32 (35,78)	69,56 (31,62)
No embarazo (n=10)	21,88 (13,88)	16,09 (8,18)	80,39 (69,17)	76,78 (53,38)
<i>p^a</i>	<i>0,168</i>	<i>0,878</i>	<i>0,865</i>	<i>0,180</i>

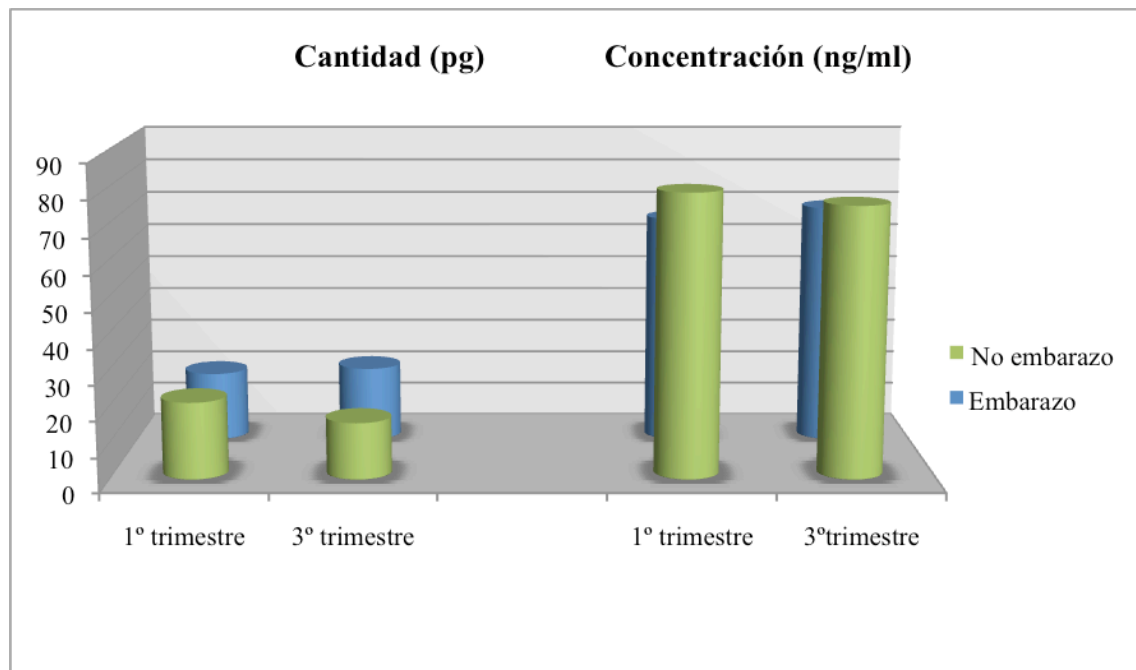


Tabla 48 y Figura 67: Comparación de la cantidad y concentración de PGE2 entre el grupo de mujeres embarazadas y no embarazadas, en las visitas correspondientes al primer y tercer trimestre del embarazo.

^a Test de Mann-Whitney.

3.3. Comparación post-parto con no embarazo

3.3.1. Variables clínicas

Tres meses después del parto las mujeres del grupo embarazo presentaron:

- un **índice de placa** de toda la boca significativamente superior que el de las no embarazadas en la visita de los seis meses ($p=0,008$). Lo mismo ocurre analizando de forma aislada los dientes anteriores ($p=0,019$), los dientes posteriores ($0,008$), las caras interproximales ($p=0,025$) y las libres ($p=0,006$).
- un **porcentaje de localizaciones con placa** significativamente mayor que el de las que no han estado embarazadas (57,81% frente a 43,07%) ($p=0,012$).

	General	Anteriores	Posteriores	Proximales	Libres
Post-parto	0,72 (0,28)	0,68 (0,33)	0,76 (0,28)	0,64 (0,28)	0,81 (0,31)
No embarazo	0,50 (0,23)	0,46 (0,26)	0,54 (0,25)	0,45 (0,24)	0,55 (0,26)
p^a	0,008	0,019	0,008	0,025	0,006

Tabla 49: Comparación del IP de toda la boca, de dientes anteriores y posteriores y de caras interproximales y libres entre el grupo de post-parto y el de no embarazo.

^a: Prueba T para muestras independientes.

Índice gingival

- un **índice gingival** de toda la boca significativamente superior que el de las mujeres no embarazadas ($p=0,001$). Lo mismo ocurre con el índice gingival de los dientes anteriores ($p<0,001$), de los posteriores ($p=0,004$), de las caras interproximales ($p=0,008$) y de las libres ($p<0,001$).
- un **porcentaje de localizaciones con inflamación o con sangrado** significativamente superior que el de las que no han estado embarazadas ($p=0,001$).

	General	Anteriores	Posteriores	Proximales	Libres
Post-parto	0,98 (0,40)	0,93 (0,39)	1,02 (0,45)	0,83 (0,43)	1,12 (0,40)
No embarazo	0,58 (0,28)	0,47 (0,30)	0,66 (0,29)	0,50 (0,35)	0,66 (0,29)
p^a	0,001	<0,001	0,004	0,008	<0,001

Tabla 50: Comparación entre el IG de toda la boca, de dientes anteriores y posteriores y de caras interproximales y libres entre el grupo de post-parto y el de no embarazadas.

^a: Prueba T para muestras independientes.

Reacción inflamatoria a la placa

- una **reacción inflamatoria a la placa** (IG/IP) similar al de las mujeres que no han estado embarazadas ($p=0,235$). Lo mismo ocurre en dientes anteriores ($p=0,109$), posteriores ($p=0,623$), caras interproximales ($0,191$) y caras libres ($p=0,384$), así como si se analiza en forma de porcentajes (inflamación/placa, $p=0,110$; y sangrado/placa, $p=0,094$).

	General	Anteriores	Posteriores	Proximales	Libres
Post-parto	1,53 (0,99)	1,79 (1,75)	1,46 (0,80)	1,67 (1,73)	1,52 (0,72)
No embarazo	1,22 (0,54)	1,11 (0,57)	1,34 (0,67)	1,12 (0,53)	1,33 (0,74)
p^a	<i>0,235</i>	<i>0,109</i>	<i>0,623</i>	<i>0,191</i>	<i>0,384</i>

Tabla 51: Comparación de la variable reacción inflamatoria a la placa en toda la boca, en dientes anteriores y posteriores, en caras interproximales y libres, entre el grupo de post-parto y el de no embarazadas.

^a: Test de Mann-Whitney.

Por tanto, se observa que tres meses tras el parto se siguen manteniendo las diferencias ES que existían durante el embarazo para el índice de placa, el índice gingival, el porcentaje de localizaciones con placa y el porcentaje de localizaciones con sangrado. Las diferencias en cuanto a la reacción inflamatoria a la placa (IG/IP) que existía durante el embarazo desaparece ($p>0,05$).

3.3.2. Niveles de hormonas en saliva

- Tres meses tras el parto las mujeres recuperaron los niveles habituales de hormonas en saliva siendo éstos similares a los que existieron en mujeres no embarazadas a lo largo del estudio ($p=0,186$ para la progesterona y $p=0,540$ para el estradiol).

Hormonas en saliva (pg/ml)		
	Progesterona - media (DE)	Estradiol - media (DE)
Post-parto (n=26)	11,11 (20,16)	0,02 (0,09)
No embarazo (n=20)	40,03 (91,12)	0,01 (0,04)
p^a	<i>0,186</i>	<i>0,540</i>

Tabla 52: Comparación de la concentración de progesterona y estradiol en saliva entre el grupo de post-parto y el de no embarazadas.

^a: Test de Mann-Whitney.

3.3.3. Variables bioquímicas en FCG

- Tres meses tras el parto los niveles de IL-1 β en FCG en las mujeres que han estado embarazadas fueron significativamente superiores que los de aquellas que no han estado embarazadas ($p < 0,001$).
- En cuanto a los niveles de prostaglandina E2, se siguió manteniendo la misma tendencia que durante el embarazo, según la cual, no existían diferencias ES entre las mujeres que han estado embarazadas y aquellas que no lo han estado durante el periodo de este estudio

IL-1 β - media (DE)		
	Cantidad (pg)	Concentración (ng/ml)
Post-parto (n=26)	17,46 (16,64)	51,78 (53,58)
No embarazo (n=20)	4,54 (5,90)	12,00 (10,69)
p^a	<i><0,001</i>	<i><0,001</i>

Tabla 53: Comparación de la cantidad y concentración de IL-1 β en FCG entre las mujeres del grupo de post-parto y las de no embarazo.

^a: Test de Mann-Whitney.

PGE2 - media (DE)		
	Cantidad (pg)	Concentración (ng/ml)
Post-parto (n=26)	20,71 (8,80)	50,36 (23,06)
No embarazo (n=10)	16,09 (8,18)	76,78 (53,38)
p^a	<i>0,347</i>	<i>0,074</i>

Tabla 54: Comparación de la cantidad y concentración de PGE2 en FCG entre las mujeres del grupo post-parto y las del no embarazo.

^a: Test de Mann-Whitney.

Capítulo V.

DISCUSIÓN

1. Metodología del estudio.
2. Principales limitaciones del estudio.
3. Parámetros clínicos.
4. Parámetros hormonales.
5. Parámetros inmunológicos.
6. Líneas de investigación futuras.

El embarazo o gestación es el periodo que transcurre entre la fecundación del óvulo por el espermatozoide y el momento del parto. Durante este tiempo todos los órganos maternos se modifican para adaptarse al desarrollo del feto. Esto va a determinar la aparición de una serie de cambios a nivel cardiovascular, pulmonar, genital, urinario o gastrointestinal, entre otros (Usandizaga & de la Fuente 2005).

A nivel oral se ha descrito la presencia de una respuesta gingival exagerada, conocida con el nombre de gingivitis gravídica y que se manifiesta como un incremento en la inflamación, el enrojecimiento y el sangrado gingival y que desaparece tras el parto sin dejar alteraciones permanentes en el periodonto (Arafat 1974, Cohen et al. 1969, Cohen et al. 1971, Conde Vidal 1981, Gursoy et al. 2008, Hugoson 1970, 1971, Jonsson et al. 1988, Kinnby et al. 1996, Kornman & Loesche 1980, Loe 1965, Loe & Silness 1963, Machuca et al. 1999, Miyazaki et al. 1991, Muramatsu & Takaesu 1994, O'Neil 1979b, Samant et al. 1976, Silness & Loe 1964, Taani et al. 2003, Tilakaratne et al. 2000, Yalcin et al. 2002b, Zaki et al. 1984).

La prevalencia con la que la gingivitis gravídica se presenta en la población varía en función del estudio analizado en un rango bastante amplio, que se extiende desde el 36% de Maier y Orban (1949) hasta el 100% de Loe y Silness (1963). Tampoco está claro cuál es el mecanismo etiopatogénico responsable de estas alteraciones (Amar & Chung 1994, Figuero-Ruiz et al. 2006, Garrido de Cabo 1999, Guncu et al. 2005, Laine 2002, Mariotti 1994, Mascarenhas et al. 2003, Mealey & Moritz 2003, Sooriyamoorthy & Gower 1989, Soory 2000, Zachariasen 1993). Por ello, se ha propuesto que los cambios en el sistema inmune materno (Lopatin et al. 1980, O'Neil 1979a, Raber-Durlacher et al. 1993, Raber-Durlacher et al. 1991), el incremento en la vascularización y en el flujo vascular (ElAttar & Hugoson 1974, Hugoson 1970, Lindhe & Branemark 1967a, b, 1968a, b, Lindhe et al. 1967, Lindhe & Sonesson 1967), las alteraciones en la barrera epitelial (Mariotti 1994) y los cambios en la microflora subgingival (Jensen et al. 1981, Jonsson et al. 1988, Kornman & Loesche 1980, 1982, Muramatsu & Takaesu 1994, Raber-Durlacher et al. 1994) pueden jugar un papel importante en esta patología.

De forma global la aparición de esta respuesta gingival exagerada característica del embarazo puede explicarse mediante dos posibles hipótesis:

1. Hipótesis “inmunológica” (O,Neil 1979, Kornman & Loesche 1980, Lopatin et al. 1980, Raber-Durlacher et al. 1993).

Durante el embarazo se producen una serie de cambios a nivel sistémico, caracterizados entre otros, por una alteración en el sistema inmune materno dirigida a evitar el rechazo materno del feto (González-Merlo 2006, Iglesias 2002, Gutiérrez, 2006). Dichos cambios a nivel sistémico tendrían una repercusión en la respuesta inmune local a nivel oral, que no sería capaz de responder de forma adecuada frente a los agentes etiológicos responsables de la aparición de la gingivitis (placa bacteriana). El equilibrio entre respuesta inmune y agentes etiológicos (equilibrio huésped-parásito) característico del estado de salud periodontal se vería modificado, lo que permitiría la actuación de las bacterias presentes en el biofilm oral que inducirían la aparición de inflamación, sangrado y enrojecimiento gingival (gingivitis gravídica). Cuando el sistema inmune materno se restablece tras el parto, la condición inflamatoria se resuelve y el equilibrio huésped-parásito queda re-establecido.

2. Hipótesis “fisiológica” (Raber-Durlacher et al. 1991).

Se sabe que durante el embarazo se producen una serie de cambios fisiológicos a nivel general del organismo. Cuando dichas alteraciones ocurren a nivel oral, clínicamente se asemejan a una respuesta gingival exagerada. Sin embargo, en realidad no representan una reacción inflamatoria, si no, una manifestación clínica local de los cambios fisiológicos característicos del embarazo (edema, hipervolemia, vasodilatación) pero sin alteración de la respuesta inmunitaria. Es posible que una vez se haya creado este nuevo ambiente local, las condiciones de la zona cambien hacia un estado de anaerobiosis, lo que favorecería de forma indirecta la proliferación de ciertos patógenos periodontales y tras ello, el desencadenamiento de una respuesta inmune local, con liberación de mediadores de la inflamación hacia el surco gingival.

Parece que en cualquiera de las dos hipótesis se produciría antes o después una alteración de la respuesta inmune local. Dos de los principales mediadores de la respuesta inmuno-inflamatoria en la gingivitis son la IL-1 β y la PGE2 (Kornman et al. 1997), por lo que información sobre la potencial alteración de sus niveles a lo largo del embarazo puede ayudar en la explicación de su etiopatogenia.

Por otro lado, estudios *in vitro* han demostrado que tanto la progesterona como el estradiol son capaces de alterar de forma directa los niveles de IL-1 β (Polan et al. 1990, Morishita 1999) y PGE2 (El-Attar 1976, 1982, Miyagi et al. 1993).

Por todo ello, el presente estudio observacional longitudinal fue diseñado con la intención de confirmar el desarrollo de una respuesta inflamatoria marcada previamente descrita en la literatura de mujeres gestantes (Arafat 1974, Cohen et al. 1969, Cohen et al. 1971, Conde Vidal 1981, Gursay et al. 2008, Hugoson 1970, 1971, Jonsson et al. 1988, Kinnby et al. 1996, Kornman & Loesche 1980, Löe 1965, Loe & Silness 1963, Machuca et al. 1999, Miyazaki et al. 1991, Muramatsu & Takaesu 1994, O'Neil 1979b, Samant et al. 1976, Silness & Loe 1964, Taani et al. 2003, Tilakaratne et al. 2000, Yalcin et al. 2002b, Zaki et al. 1984) y determinar si esta reacción puede estar asociada con un cambio en los niveles de IL-1 β y PGE2 en FCG y/o con el aumento en los niveles de hormonas sexuales femeninas (progesterona y estradiol) en saliva.

Los resultados nos muestran que durante el embarazo se produce un incremento significativo en el grado de inflamación gingival a pesar de que los niveles de placa permanecen estables e incluso tienen cierta tendencia a disminuir. Esto se confirma mediante el análisis del cociente IG/IP, según el cual, el grado de reactividad gingival frente a la placa se incrementa de forma significativa a lo largo del embarazo y se reduce tres meses tras el parto.

Esta tendencia encontrada en los parámetros clínicos se repite en los parámetros bioquímicos: concentración de progesterona y estradiol en saliva y niveles de IL-1 β y PGE2 en FCG. Sin embargo, no todos los cambios resultan significativos, probablemente debido al bajo número de pacientes y a las amplias desviaciones estándar encontradas.

Por otro lado, no se encuentra ninguna correlación estadísticamente significativa entre el incremento en el grado de inflamación gingival y el incremento en los niveles de hormonas sexuales en saliva.

1. Metodología del estudio

La **población seleccionada** estaba formada por un grupo de mujeres embarazadas sin evidencia de periodontitis presente ni pasada, que fue comparada con un grupo control de mujeres no embarazadas. Aunque todos los estudios transversales publicados centrados en la afectación del periodonto durante el embarazo comparan los datos de las mujeres embarazadas con los de un grupo de mujeres no embarazadas, (salvo los de Conde Vidal 1981 y Machuca et al. 1999), entre los estudios longitudinales, sólo los de Cohen et al. 1971, Kornman 1980, Tilakaratne et al. 2000 y Gursoy et al. 2008, poseen también un grupo control de mujeres no embarazadas.

Las mujeres fueron seleccionados gracias a un fase de diagnóstico clínico inicial en la que se incluía la evaluación de la profundidad de sondaje y la pérdida de inserción clínica, sin embargo, estos parámetros no volvieron a ser registrados a lo largo del estudio, ya que ha sido previamente demostrado que las mujeres embarazadas no sufren una alteración permanente de su situación periodontal (Cohen et al. 1969, Cohen et al. 1971, Gursoy et al. 2008, Hugoson 1970, 1971, Loe 1965, Loe & Silness 1963, Lundgren & Lindhe 1971, O'Neil 1979b, Tilakaratne et al. 2000).

El tamaño muestral se seleccionó mediante un cálculo previo basado en los resultados de otros estudios de naturaleza longitudinal encontrados previamente en la literatura (Cohen 1969, Tilakaratne et al. 2000). Para ello se tomó como referencia el índice gingival, de tal modo que se diseñó el estudio para tener suficiente potencia como para detectar una diferencia mínima de 0,15 puntos.

El tamaño muestral obtenido nos permitió asegurarnos encontrar diferencias significativas en el índice gingival; sin embargo, no garantiza que se encuentren diferencias en los niveles de IL-1 β o PGE2 en FCG. Es más, con los resultados obtenidos, hubiéramos necesitado aumentar mucho el tamaño muestral para poder encontrarlas (97 mujeres embarazadas para encontrar diferencias significativas en la cantidad de IL-1 β a lo largo del embarazo o 2652 mujeres embarazadas en el caso de la cantidad de PGE2).

Las mujeres fueron seguidas de *forma longitudinal* a lo largo de los tres trimestres del embarazo y fueron de nuevo evaluadas tres meses tras el parto. Este diseño está de acuerdo con otros similares planificados para evaluar el efecto del embarazo en el periodonto (Cohen et al. 1969, Kinnby et al. 1996, Tilakaratne et al. 2000).

Se seleccionó un diseño longitudinal frente a uno transversal, debido a que esta metodología permite un mejor control de los factores de confusión que pudieran afectar a los resultados, ya que el mismo grupo de individuos es evaluado a lo largo de todo el periodo de estudio (Calatayud y Martin 2002, Delgado & Domenech 2009). En la literatura podemos encontrar artículos con ambas metodologías, aunque los más recientes tienden a ser estudios de seguimiento (Tilakaratne et al. 2002, Gürsoy et al. 2008). En la tabla 61 se han registrado los datos de los estudios transversales y en la tabla 62, los datos correspondientes a los estudios longitudinales.

Prácticamente todos los estudios que aparecen en la tabla son puramente observacionales, sólo el de O'Neil, 1979 da instrucciones de higiene oral (IHO), el de Hugoson 1971 realiza rapado y alisado radicular (RAR) e IHO ocho semanas tras el parto, el de Yalcin et al. 2002b realiza RAR y da IHO al inicio de cada trimestre y por último el de Gürsoy et al. 2008 realiza RAR e IHO cuando se considera necesario, aunque no especifica a cuantas pacientes se les da ni estratifica los resultados en base a esta intervención. En este caso, se ha preferido un diseño observacional, con la intención de imitar en la medida de lo posible la situación real de las mujeres embarazadas que no acuden al odontólogo a lo largo del mismo. Por razones éticas, todas las mujeres reciben IHO, caracterizadas por técnica de cepillado (Bass) sin realizar especial énfasis en la higiene interproximal.

Las variables respuesta registradas en este estudio son: desde un punto de vista clínico, el índice de placa de Silness y Løe (1963) y el índice gingival de Løe y Silness (1964); desde un punto de vista hormonal, la concentración de progesterona y estradiol en saliva y desde un punto de vista inmunológico, la concentración y la cantidad de IL-1 β y PGE2 en FCG. Además, todas las mujeres rellenan un cuestionario que permite conocer sus características socio-económicas.

En las tablas 61 y 62 se observa que los índices clínicos seleccionados son los empleados de forma recurrente por los estudios publicados previamente en la literatura. Otras variables analizadas a lo largo de la historia han sido la cantidad de depósitos duros, el sangrado al sondaje, la profundidad de sondaje, el índice periodontal de necesidades terapéuticas comunitarias (CPITN), la movilidad dentaria y el nivel de inserción clínico.

En cuanto al *número de dientes seleccionados para el análisis clínico*, este estudio coincide con la inmensa mayoría de los artículos publicados a partir de 1974, en los que se incluyen todos los dientes. A partir de esa fecha, sólo el estudio transversal de Miyazaki et al. (1991) y el longitudinal de O'Neil (1979) consideran únicamente los dientes de Ramfjord.

Las *localizaciones empleadas para la toma de las muestras de FCG* varía entre los diferentes estudios, con autores que seleccionan la cara vestibular de los incisivos inferiores (Holm-Pedersen y Løe 1967), la mesial de los caninos, de los incisivos laterales y el incisivo central derecho (Hugoson 1971) o la cara mesiovestibular de dos dientes de la región anterior sin especificar (Yalcin et al. 2002b), aunque como vemos todos ellos se centran en la región anterior.

A diferencia de este grupo de autores, Kinnby et al. (1996) toman muestras de FCG mediante discos Millipore ® en 44 localizaciones de cada mujer, agrupando todas las muestras obtenidas en cada visita en una sola, de forma similar a cómo lo realiza Canazki et al. (2007) en mesiovestibular y distopalatino de tres dientes en cada cuadrante (molar, premolar, incisivo/canino), lo que hace un total de 24 muestras en cada mujer.

Algunos autores incluso no especifican las localizaciones seleccionadas para tomar las muestras de FCG (Offenbacher et al. 1998, Konopka et al. 2003)

Considerando esta variabilidad, seleccionamos para la toma de muestras de FCG la cara mesio-vestibular de ambos caninos superiores (13 y 23) basándonos en los estudios clínicos previos que habían descrito mayor inflamación y sangrado en la región anterior (Raber-Durlacher et al. 1993, Raber-Durlacher et al. 1994) y mayor incremento

en el valor del índice gingival en la región anterior (Löe 1965, Loe & Silness 1963) y en las localizaciones interproximales (Hugoson 1971).

Otros autores han determinado *los niveles de hormonas en saliva* (Jonsson et al. 1988, Muramatsu et al. 1994, Zaki et al. 1984) o en sangre (Hugoson 1971, O'Neil 1979, Kornman & Loesche 1980), han realizado test microbiológicos (Jonsson et al. 1988, Kornman & Loesche 1980, Muramatsu et al. 1994) o cuestionarios (Gursoy et al. 2008, Machuca et al. 1999, Tilakaratne et al. 2000, Yalcin et al. 2002) y sólo unos pocos recogen muestras de FCG para determinar los niveles del inhibidor de la actividad del plasminógeno (PAI) (Kinnby et al. 1996) o los niveles de PGE2 (Yalcin et al. 2002). Sin embargo, a nuestro entender, éste es el primer estudio observacional prospectivo que, además de realizar cuestionarios a los sujetos, analiza tres tipos de variables (clínicas, hormonales e inmunológicas) de forma simultánea en mujeres embarazadas sin periodontitis. Además, como se observa en las tablas, los estudios transversales publicados han sido realizado en Noruega, Estados Unidos, India, España, Egipto, Canadá, Japón y Jordania. Los estudios longitudinales pertenecen en su mayoría a poblaciones de Estados Unidos, aunque también hay estudios de Suecia, Inglaterra, India, Turquía o Finlandia. Como podemos comprobar, no existe ningún estudio prospectivo de estas características realizado en España.

Autor, año	País	Embarazadas (E) / No embarazadas (NE)	Dientes medidos	Variables analizadas
Løe, 1963	Noruega	E: 121 NE: 61 (PP)	16, 12, 24, 26, 32, 44	IG (L&S)
Silness, 1964	Noruega	E: 121 (2, 3, 4, 5, 6, 8, 9t) NE: 61 (2, 3, 4, >5m PP)	16, 12, 24, 26, 32, 44	IP (S&L); DD (Ramfjord 1959)
Arafat, 1974	EEUU	E: 477 NE: 233	Todos	IP (Greene); CP (Russell)
Samant, 1976	India	E: 40 (1°); 40 (2°); 40 (3°) NE: 40	Todos	IG (L&S); CP (Russell); IP & DD (Greene).
Conde Vidal, 1981	España - Barcelona	E: 5 (1°); 9 (2°); 46 (3°)	---	Patología gingival
Zaki, 1984	Egipto	E: 10 (1°); 10 (2°); 10 (3°). NE: 10	---	IP (S&L); IG (L&S); HormS
Jonsson, 1988	Canada	30 E 30 NE	Todos	PS; IP; SS; Micro; HormS
Miyazaki, 1991	Japón	E: 2424 NE: 1565	Ramfjord	CPITN
Muramatsu, 1994	Japón	E: 19 NE: 12; PP (5m): 8	Todos	IG; SS; PS; Micro; HormS
Machuca, 1999	España - Sevilla	E: 130	Todos	IP (O'Leary); SS; PS; NIC; Cuestionario
Taani, 2003	Jordania	E: 200 (29 1°; 61 2°; 110 3°) NE: 200	Todos	IP (S&L), IG (L&S); PS; NIC

Tabla 55: Estudios transversales sobre la gingivitis gravídica.

Leyenda: PP (post-parto); m (mes); IG (índice gingival); L&S (Løe y Silness); IP (índice de placa); S&L (Silness y Løe); DD (depósitos duros); CP (condición periodontal); HormS (hormonas en saliva); SS (sangrado al sondaje); Micro (dianóstico microbiológico); CPITN (Índice Periodontal de Necesidades Terapéuticas Comunitarias); PS (profundidad de sondaje); NIC (nivel de inserción clínica).

Autor, año	País	E / NE	Seguimiento	Dientes	Variables analizadas
Cohen, 1969	EEUU	E: 16	1º, 2º, 3º T, 3m PP	Todos	CP (Rusell), IP, DD; Movilidad
Cohen, 1971	EEUU	E: 15 NE: 16	1º, 2º, 3º T, 3m & 15m PP	Todos	CP; IP; DD; Movilidad
Hugoson, 1971	Suecia	E: 26	E: 12, 18, 24, 30, 34 y 38 s PP: 1-3 d, 8 y 20 s	16, 12, 24, 36, 32, 44, 13, 23, 12, 22, 11	IP (S&L); IG (L&S); FCG; PS; Hormonas en sangre
Chaikin 1977	EEUU	E: 267S y 152G/PE	Mensualmente hasta 11 m PP	Todos	Gingivitis - localización y severidad
O'Neil, 1979	Inglaterra	E: 26	Semana 14 y 30	Ramfjord	IP(S&L); IG (L&S); Hormonas en sangre
Kornman, 1980	EEUU	E: 20 NE: 11	Mensualmente E: hasta PP NE: 4 meses	24 y 33 Interproxi males	IG (L&S); IP (S&L); SS; Micro; Hormonas en sangre
Kinnby, 1996	Suecia	E: 14	3ºT y 3m PP	Todos salvo 2º M	IP (S&L); IG (L&S); PS; FCG (PAI)
Tilakaratne 2000	India	E: 47 NE: 47	1, 2, 3 T, 3m PP	Todos	IP (S&L); IG (L&S); NIC; Cuestionario
Yalcin, 2002a	Turquía	E: 61	1, 2, 3 T	Todos	IP (S&L); IG (L&S); PS; Cuestionario
Yalcin, 2002b	Turquía	E: 22	1, 2, 3 T	Todos y 2 dientes ant	IP (S&L); IG (L&S); PS, FCG (PGE2)
Lieff, 2004 OCAP	EEUU	E: 903	<25 semanas y 48h PP	Todos	PI (V); GI (V); PS; NIC; SS; Cuestionario
Gursoy, 2008	Finlandia	E: 24 NE: 22	E: 1, 2, 3T, 2s PP y tras lactancia NE: 1, 2, 3 y 4m	Todos	IP (+/-); SS (0-2); PS, NIC; Cuestionario
***	España	E: 42 (26) NE: 28 (19)	E: 1, 2, 3 T, 3 m PP NE: 0 y 6 meses	Todos	IP (S&L); IG (L&S); Cuestionario; HormS, FCG (IL-1β, PGE2)

Tabla 56: Estudios longitudinales sobre la gingivitis del embarazo.

2. Principales limitaciones del estudio

Una de las principales limitaciones de este estudio es la **alta incidencia de pérdida de sujetos** a lo largo del periodo de seguimiento en ambos grupos. A pesar de ello, el análisis estadístico no encontró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de mujeres que acude a todas las visitas (IAS) y aquellas que sólo acuden a alguna de ellas (AVO). Además, ya que se trata de un estudio observacional y no un ensayo clínico, el potencial impacto de las pérdidas en los resultados también pudiera ser menos relevante.

En cualquier caso, se ha realizado el análisis estadístico con todas las muestras (IAS, IAS-P y AVO) y los resultados obtenidos presentan valores de significación de la misma magnitud, por lo que para evitar la reiteración de datos se ha optado por presentar sólo los correspondientes a las 42 mujeres de las cuales se disponía de las tres primeras visitas para describir el embarazo (IAS-P) y los correspondientes a las 26 embarazadas que completan las cuatro visitas del estudio para referirse a la comparativa entre embarazo y postparto (IAS).

Respecto a las mujeres no embarazadas y por una razón similar se ha optado por los datos correspondientes a las 20 mujeres que completan el estudio.

Los **criterios de selección** empleados son similares a los de otros estudios observacionales relacionados. Se ha hecho especial hincapié en la exclusión de fumadoras de la población de estudio, por su conocido papel en el periodonto tanto a nivel clínico como inmunológico (Rivera-Hidalgo 2003, Bergstrom 2003, McGuire & Nunn 1999), así como de mujeres tomando anticonceptivos orales, ya que, a pesar de que ciertos autores no encuentran una evidencia de efectos de los mismos a nivel gingival (Preshaw et al. 2001, Taichman & Eklund 2005) la mayor parte de ellos sí que la encuentran (Zachariasen 1993, Tilakaratne et al. 2000a, Mullally et al. 2007). Debido a que uno de los objetivos concretos de nuestro estudio era determinar los niveles hormonales de las mujeres, se prefirió optar por su exclusión con el fin de no introducir factores de confusión en el análisis de datos.

Este estricto proceso de selección de pacientes ha determinado que no exista **una completa homogeneidad** entre ambos grupos de estudio, ya que las mujeres

embarazadas eran mayores que las no embarazadas, poseían menor nivel de estudios y distinto tipo de profesiones.

Esto puede ser debido a que ambos grupos de estudio no han sido seleccionados entre la misma población de referencia (ambulatorio José Marvá y servicio de recepción de pacientes de la facultad de odontología de la UCM); pero también a que la edad media de embarazo en España ha aumentado en los últimos años, especialmente debido a la incorporación de la mujer al mundo laboral, lo que explicaría la diferencia de edad entre ambos grupos. Este dato pudiera tener una especial repercusión en los resultados de nuestro estudio si consideramos que Fransson et al. (1999) encontró diferencias en la respuesta inflamatoria frente a la formación de placa de novo en sujetos jóvenes y mayores. Sin embargo, la diferencia de edad entre sus grupos de estudio era elevada: 20-25 años frente a 65-80 años, por lo que sus resultados no son directamente aplicables a este estudio, en el que ambos grupos presentan una diferencia media de seis años de edad (30,15 frente a 24,38 años).

Es importante resaltar el gran esfuerzo realizado para reclutar a las mujeres pertenecientes al grupo de no-embarazo según los criterios de inclusión propuestos, puesto que como demuestran los datos epidemiológicos en España una alta proporción de mujeres en las décadas de los veinte y los treinta años son fumadoras o están tomando anticonceptivos orales (Maroto de Agustín et al. 1998, Saiz Martínez-Acitores et al. 2003).

Por otro lado, en relación con la profesión y con el nivel de estudios, a pesar de que se han obtenido diferencias significativas entre los grupos, los resultados son similares a los aportados por Machuca et al. (1999) y Yalcin et al. (2002).

En cuanto a lo que se refiere a los cuidados bucodentales previos de ambos grupos de estudio, no se encuentran diferencias significativas en la frecuencia de cepillado ni en la última visita al odontólogo. Esto nos permite deducir que cabría esperar unos resultados similares de índice de placa entre ellos, siendo posible por tanto su comparación en cuanto a los demás parámetros.

3. Parámetros clínicos

3.1. Índice de placa

En este estudio, no se observan cambios significativos en el IP a lo largo del embarazo, lo que coincide con los resultados aportados por la mayor parte de los autores (Silness & Loe 1964, Cohen et al. 1969, Arafat 1974, Muramatsu et al. 1994 Tilakaratne et al. 2000, Taani et al. 2003) (Tabla 63).

Si se consideran sólo los artículos que emplean el índice de Silness y Loe († tabla), se puede observar que nuestros valores se encuentra en el rango de los datos publicados, con valores que varían entre 0,68 y 1,95, exceptuando el estudio de Yalcin et al. (2002) con unos valores muy elevados de IP, a pesar de haber realizar raspado y alisado radicular y dar instrucciones de higiene oral en cada uno de los trimestres del embarazo.

La disminución, aunque no estadísticamente significativa en el IP a lo largo del embarazo, puede ser debida a las instrucciones de higiene oral dadas a las mujeres en la primera visita. Otros autores en la literatura han encontrado una reducción similar en los valores de IP tras dar instrucciones de higiene oral a las embarazadas (O'Neil 1979b y Gürsoy et al. 2008) y sin darlas (Cohen et al. 1969, Hugoson 1971, Silness & Loe 1964), por lo que también se puede atribuir esta reducción a un posible efecto Hawthorne en las mujeres.

Tras el parto se observa un incremento significativo en los niveles de placa. En ese momento las mujeres refieren una mayor ocupación de su tiempo en sus hijos y una falta de atención en si mismas, lo que puede explicar este cambio. Al analizar los datos en función del tipo de diente, observamos cómo este incremento en el IP tras el parto ocurre fundamentalmente a costa de un incremento en los dientes anteriores, tanto en las caras interproximales como en las libres. Este dato resulta interesante, sobre todo considerando que, a lo largo de todo el embarazo, los dientes anteriores poseen menores valores de IP que los posteriores y tras el parto esta diferencia desaparece. La diferencia entre dientes anteriores y posteriores a lo largo del embarazo ha sido también descrita

por Silness y Løe (1964), Cohen et al. (1969), Hugoson (1971) y Raber-Durlacher et al. (1994).

Llama la atención el hecho de que las caras libres presenten un mayor valor de placa que las interproximales, a diferencia de lo que ha sido previamente descrito en la literatura (Silness y Løe 1964, Hugoson 1971). Esto puede deberse a que el índice empleado para registrar la cantidad de placa haya sido el de Silness y Løe que sólo registra una localización por lingual/palatino. Esto puede haber determinado que se infraestime el valor del IP a nivel interproximal. Sin embargo, los propios Silness y Løe (1964), encuentran mayores valores del índice de placa en interproximal, por lo que la explicación biológica para este hecho no está clara.

Por último, si evaluamos el porcentaje de localizaciones con placa observamos la misma tendencia a lo largo del embarazo y el postparto. Con los datos en este formato, podemos comparar los resultados con los aportados por el último estudio que se ha publicado al respecto (Gürsoy et al. 2008), cuyos valores son inferiores a los obtenidos en este estudio, a pesar de que consideran 6 localizaciones en cada diente. Esto puede ser debido a que la población del estudio de Gürsoy et al. (2008) recibe raspado y alisado radicular cuando los autores consideran necesario, lo que dificulta la comparativa con nuestro estudio. Destaca sin embargo, que en nuestra población la mayor parte de las embarazadas se cepillan los dientes 3 veces al día (59,6%) frente a ninguna embarazada en el estudio de Gürsoy et al. (2008) y que ambas poblaciones tienen un nivel de estudios similar. Por otro lado, el estudio de Gürsoy et al. (2008) ha sido realizado en una población Finlandesa, por lo que es posible que el factor geográfico pueda haber jugado un papel importante en estos resultados y resulta por tanto interesante conocer cómo funcionan estas entidades en diferentes localizaciones geográficas.

Autor, año	Primer trimestre	Segundo trimestre	Tercer trimestre	Post parto
Silness, 1964 ‡	0,97±0,07	0,84±0,04	0,98±0,09	0,90±0,12
Cohen, 1969	1,80±0,05	1,76±0,06	1,69±0,07	1,75±0,05
Hugoson, 1971 ‡	0,78±0,04	0,74	0,68±0,04*	Sin RAR: 0,76 Con RAR: 0,33***
Arafat, 1974	0,86	1,01	0,99	
Samant, 1976 ‡	0,72±0,06	0,99±0,08	0,69±0,08	
O'Neil, 1979 ‡	1,17		0,98	
Zaki, 1984 ‡	1,33±0,34	1,39±0,22	1,30±0,55	
Tilakaratne 2000 ‡	E: 0,68±0,28 NE: 0,58±0,30	E: 0,65±0,28 NE: 0,61±0,20	E: 0,69±0,28 NE: 0,61±0,27	E: 0,70±0,28 NE: 0,62±0,26
Yalcin, 2002a ‡	2,47±0,54	2,55±0,54	2,57±0,56	
Yalcin, 2002b ‡	2,45±0,66	2,44±0,64	2,31±0,66*	
Taani, 2003 ‡	1,84±0,10	1,88±0,06	1,95±0,05	
Gürsoy, 2008	25%	20%**	18%	15%
***	E:0,71- 52,97% NE:0,53-46,3%	E:0,65- 49,31%	E: 0,68- 52,67% NE: 0,50-43,1%	E: 0,72* - 57,82 %**

Tabla 57: Valores del IP registrados en los estudios sobre gingivitis gravídica.

Leyenda: E (embarazadas); NE (no-embarazadas); RAR (raspado y alisado radicular):

* p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

‡ Estudios que emplean el índice de placa de Silness y Löe, 1964.

3.2. Inflamación gingival

En el presente estudio se ha demostrado un incremento significativo en la severidad de la inflamación gingival (1,01 a 1,13) y en su extensión (un 51,44% de localizaciones con inflamación frente a un 57,33%) entre el primer y el segundo trimestre del embarazo, que se mantiene elevado hasta el final del mismo y disminuye tres meses tras el parto. Además, entre el segundo y el tercer trimestre del embarazo se duplica el porcentaje de localizaciones con inflamación severa (2% a 4%).

En comparación con el grupo de mujeres no embarazadas, aunque no existen diferencias significativas en el IP entre grupos en el primer trimestre del embarazo, tanto la severidad (IG) como la extensión (porcentaje de localizaciones con IG igual a 1, 2 o 3) de la inflamación gingival es significativamente superior en las mujeres embarazadas. Seis meses después, se observa como la diferencia en el grado de inflamación gingival entre las mujeres embarazadas (tercer trimestre) y las no embarazadas es aun mayor. No son muchos los estudios que han seguido de forma longitudinal a mujeres embarazadas y no embarazadas para estudiar lo que ocurre a nivel gingival (Tilakaratne et al. 2000, Gürsoy et al. 2008). Ambos estudios encuentran resultados similares a los nuestros.

La mayor parte de los artículos que han estudiado la gingivitis del embarazo refieren un incremento en la **severidad** de la inflamación gingival a lo largo del mismo con un pico máximo en el tercer trimestre (Cohen et al. 1969, Hugoson 1971, Kornman & Loesche 1980, Loe & Silness 1963, Taani et al. 2003, Tilakaratne et al. 2000, Yalcin et al. 2002b, Zaki et al. 1984) aunque otros también han encontrado dicho pico en el segundo trimestre (Arafat 1974, Gursoy et al. 2008, Muramatsu & Takaesu 1994, Samant et al. 1976).

Si seleccionamos los artículos que han empleado el IG de Loe y Silness (1963) observamos que Loe & Silness (1963), Hugoson (1971), O'Neil (1979) y Tilakaratne et al. (2000) encuentran un pico máximo de inflamación con valores cercanos a 1,33 (1,26;1,34; 1,32, 1,43, respectivamente).

Yalcin et al. (2002) presenta dos estudios que nos permiten comparar la evolución del IG con y sin raspado y alisado radicular. Sin raspado y alisado radicular (Yalcin et al. 2002a) observan un incremento estadísticamente significativo del IG a lo largo del embarazo, con un pico máximo en el tercer trimestre del mismo (1,99), mientras que con raspado y alisado radicular (Yalcin et al. 2002b) se produce una reducción significativa del mismo (1,59). Se puede ver, que, a pesar de haber recibido tratamiento periodontal, las pacientes no muestran una gran reducción en el IG, que está incluso por encima del valor que presentaban otros estudios previos. Hay que recordar que este autor presentaba los valores más elevados de IP a lo largo del estudio, por lo que parece posible que la motivación de estas pacientes frente al tratamiento sea baja.

El estudio de Taani et al. (2003), es el que refleja los valores más elevados de IG a lo largo del embarazo y aquí de nuevo el pico máximo se encuentra en el tercer trimestre (2,60).

Todos estos estudios obtienen picos de inflamación superiores a los encontrados en nuestro estudio (1,13). Nuestros valores son más parecidos a los aportados por Samant et al. (1976) (1,04), donde curiosamente el pico máximo de inflamación también se produce en el segundo trimestre del embarazo y en el cual los valores del IP son también similares a los aquí obtenidos. Se trata sin embargo de un estudio transversal lo cual incrementa el riesgo de factores de confusión en la interpretación de los resultados.

Arafat (1974), a pesar de encontrar un ligero incremento en el índice periodontal en el segundo trimestre del embarazo, es uno de los pocos autores que no encuentra diferencias estadísticamente significativas a lo largo del mismo.

Haciendo un análisis detallado de este incremento en la severidad de la inflamación gingival en función del *tipo de diente y de la localización*, observamos que dicho incremento es más marcado en los dientes anteriores y en las localizaciones interproximales. Estos resultados están de acuerdo con los descritos previamente por Løe y Silness (1963), Hugoson (1971) y Raber-Durlacher (1994). Este dato resulta interesante, sobre todo si recordamos que estos mismos autores tampoco habían encontrado un incremento en la acumulación de placa a lo largo del embarazo en los

dientes anteriores, aunque sí una mayor acumulación en las superficies de los dientes posteriores.

Sin embargo, y pesar de que los resultados entre los autores coinciden, hasta ahora no se expuesto ninguna hipótesis para tratar de explicar esta predilección por las zonas anteriores durante el embarazo. Una posible hipótesis para este incremento puede encontrarse en las manifestaciones otorrinolaringológicas características del mismo. Así, se ha descrito la aparición de una rinitis del embarazo (vasomotora o alérgica), que afectaría a aproximadamente el 30% de las mujeres embarazadas (Gani et al. 2003, Saynes 2006, Velázquez 2006). Comienza en el primer mes de embarazo, aumenta en el segundo trimestre y se resuelve una semana después del parto (Velázquez 2006). La rinitis vasomotora se debe a un incremento del flujo sanguíneo y de la secreción de las glándulas en la vía aérea y a una mayor relajación del músculo liso por la acción de la progesterona y el estradiol (Velázquez 2006). Todos estos hechos van a dificultar la respiración nasal, lo que conlleva un incremento de la respiración oral (Saynes 2006). La respiración oral ha demostrado influenciar el grado de inflamación gingival en los dientes ántero-superiores, especialmente en las localizaciones palatinas (Wagaiyu & Ashley 1991). De esta forma, aunque los efecto directos del embarazo a nivel oral estén afectando en realidad a todas las localizaciones de la boca, de forma indirecta, la respiración oral agravaría la situación de las zonas anteriores.

Tres meses tras el parto los valores de IG se recuperan y alcanzan valores similares a los encontrados en el primer trimestre del embarazo. Sin embargo, y de acuerdo con los estudios de Løe y Silness (1963), Hugoson (1971) y Tilakaratne et al. (2000), es en ese momento cuando se incrementan los valores del IP. Parece por tanto, que algún otro factor, a parte de la placa es el responsable del incremento en la severidad de la inflamación gingival a lo largo del embarazo.

En cuanto a la *extensión* de la inflamación gingival, nuestros datos concuerdan con los aportados por Samant et al. (1976), que observan un incremento en el porcentaje de localizaciones con gingivitis severa entre el primer y el tercer trimestre del embarazo (del 2,5% al 10%), aunque en nuestro caso, el porcentaje de localizaciones con inflamación moderada aumenta entre primer y segundo trimestre, pero no entre segundo y tercero.

Por último, el estudio de Gursoy et al. (2008) muestra los valores en forma de porcentaje de localizaciones con sangrado al sondaje. Haciendo un análisis adecuado de nuestros datos (porcentaje de localizaciones con IG=2 ó 3) podemos comparar nuestros resultados con los de este estudio, aunque siempre considerando que, a diferencia de nuestro estudio, en este protocolo las pacientes reciben raspado y alisado radicular al inicio del estudio cuando los autores lo consideraban necesario. Gürsoy et al. (2008) encuentran un pico máximo de sangrado al sondaje en el segundo trimestre del embarazo (34%). Esto concuerda con nuestros resultados, aunque el valor que nosotros obtenemos es superior (52,45%), lo cual es congruente con las diferencias en los valores del índice de placa y en la metodología (raspado y alisado radicular) de ambos estudios.

Parece claro por tanto, que a lo largo del embarazo se produce un incremento en la severidad y en la extensión de la inflamación gingival, sin embargo no hay un acuerdo entre los distintos estudios publicados en cuanto a la magnitud de dicho incremento y al momento en el cual se produce. Para poder explicar dicha variabilidad es necesario considerar factores tales como el grado de higiene oral de las mujeres (IP) y factores intrínsecos a cada mujer en particular (susceptibilidad) o a la población seleccionada de forma global. En cuanto al grado de higiene oral, parece que no es el único factor responsable, puesto que en estudios con valores de placa similares (Tilakaratne et al. 2000), los valores del IG son diferentes. Estas diferencias pueden por tanto ser atribuidas a variaciones en la fuerza de sondaje (Lang et al. 1991), en el tipo de sonda empleada (Jordan, OMS, CPC-12) (Barendregt et al. 2006) o en la reproducibilidad de los examinadores (Gibbs et al. 1988), que varían de forma marcada entre los diferentes estudios publicados.

Autor, año	Primer trimestre	Segundo trimestre	Tercer trimestre	Post-parto
Löe, 1963 ‡	2m: 0,89 3m: 1,04	4m: 0,91 5m: 0,97 6m: 1,05	7m: 1,06 8m: 1,26* 9m: 0,91	0,82±0,11
Cohen, 1969	2,23±0,13	2,48±0,14**	2,57±0,14**	2,32±0,16**
Hugoson, 1971 ‡	0,92±0,04	1,12	1,34±0,06**	No RAR: 0,73±0,05** RAR: 0,43±0,06***
Arafat, 1974	0,77	0,94	0,72	
Samant, 1976 ‡	0,71±0,09 SG: 2,5%	1,04±0,1 SG: 7,5%	0,94±0,1 SG: 10%	
O'Neil, 1979 ‡	1,14		1,32*	
Kornman, 1980 ‡	1,16	1,44	1,61	
Zaki, 1984 ‡	1,39±0,22	1,73±0,32	1,84±0,45	
Muramatsu, 1994	1m: 3,33 2m: 5,6 3m: 9,26*	4m: 7,32* 5m: 6,57 6m: 7,75*	7m: 6,55 8m: 6,5 9m: 3,81	5,45±1,53
Tilakaratne 2000 ‡	E: 1,15±0,30 NE: 0,93±0,32	E: 1,28±0,38* NE: 0,93±0,35	E: 1,43±0,32* NE: 0,89±0,29	E: 1,14±0,28* NE: 0,90±0,30
Yalcin, 2002a ‡	1,79±0,35	1,95±0,38***	1,99±0,37***	
Yalcin, 2002b ‡	1,77±0,38	1,73±0,39***	1,59±0,34***	
Taani, 2003 ‡	2,06±0,11	2,50±0,06**	2,60±0,05**	
Gürsoy, 2008	25%	34%**	28%**	8%**
***	E: 1,01-51,44% NE: 0,65-32,9%	E: 1,13*-57,53%*	E: 1,14-56,44% NE: 0,58-29,9%	E: 0,98 -49,92%

Tabla 58: Valores del IG registrados en los estudios sobre gingivitis gravídica.

3.3. Reactividad frente a la placa

Precisamente para intentar evaluar de forma independiente la reactividad gingival evitando la variación introducida por el diferente grado de acumulación de placa en cada paciente, se empleó la variable reacción inflamatoria frente a la placa, analizada en forma de IG/IP (van der Velden et al. 1985, Abbas et al. 1986). A diferencia de otros autores (Kinnby et al. 1996) que analizan este cociente en forma de proporción de localizaciones con inflamación entre la proporción de localizaciones con placa, que da una idea de la extensión de la inflamación, aquí se ha optado por un análisis en formato de severidad, para analizar de otro modo el impacto del embarazo en el mayor o menor desarrollo de la gingivitis gravídica.

Considerando IG/IP de forma global, se observa un incremento estadísticamente significativo entre el primer y el segundo trimestre del embarazo y un descenso, también significativo, tres meses tras el parto, lo que de nuevo refuerza la idea de que, independientemente de la acumulación de placa, existe algún otro factor responsable del incremento de la inflamación gingival durante el embarazo.

Si analizamos los datos en función del tipo de diente, observamos que los dientes anteriores presentan una reacción inflamatoria a la placa superior que la de los posteriores en el tercer trimestre del embarazo, lo cual nos da una idea de una mayor afectación de la zona anterior durante el embarazo. Lo mismo ocurre en el caso de las localizaciones interproximales, más afectadas que las libres frente a una misma acumulación de placa en el segundo y el tercer trimestre del embarazo. Tras el parto todos los dientes y todas las localizaciones se comportan de igual forma, lo que de nuevo refuerza la idea de un factor asociado al embarazo afectando a la encía.

Estos datos concuerdan con los publicados por Kinnby et al. (1996), que encuentran que durante el embarazo IG/IP es de 2,0 frente a 1,2 tras el parto, aunque sus valores son superiores a los nuestros.

Por otro lado, en un intento por buscar el factor responsable de esta mayor reactividad frente a la placa, se decidió dividir la muestra de mujeres embarazadas en dos subgrupos en función del valor de IG/IP en el segundo trimestre del embarazo

(momento con el máximo valor medio). En base a ello, se obtiene un grupo con alta y otro con baja reactividad frente a la placa, siendo las diferencias entre ellos estadísticamente significativas. Sin embargo, no se logran explicar estas diferencias en base a los niveles de IL-1 β o PGE2 en FCG.

Estos datos concuerdas con las últimas publicaciones del grupo de Trombelli, que diferencian a los sujetos en alta y baja respuesta a la placa en función de los cuartiles superiores o inferiores de la distribución de los residuos de FCG (Trombelli et al. 2004). Sus resultados en cuanto a esta diferente susceptibilidad a la gingivitis experimental no consiguen ser explicados por el nivel de estrés o por variables psicosociales indicativas de la susceptibilidad al estrés (Trombelli et al. 2005), ni por la duración del tiempo de exposición a la placa (Trombelli et al. 2006) ni tampoco por polimorfismos en IL-6, TNF- α o linfotoxina alfa (Scapoli et al. 2007).

Resumiendo, durante el embarazo existe un mayor grado de reacción gingival inflamatoria frente a la acumulación de placa, especialmente en dientes anteriores y en caras interproximales, aunque los cambios en los mediadores locales de la inflamación aquí analizados no permitan explicarlo. Sería por tanto interesante encontrar el factor responsable de este cambio.

4. Parámetros hormonales

4.1. Niveles de progesterona y estradiol

Los niveles de progesterona y estradiol del presente estudio siguen el patrón característico del embarazo, con valores que se incrementan significativamente a lo largo del mismo hasta alcanzar un pico máximo en el tercer trimestre y luego caen tres meses tras el parto (Cunningham et al. 2007). En las mujeres no embarazadas, los niveles de ambas hormonas se mantienen constantes a lo largo del estudio, siendo sus valores significativamente inferiores a los de las mujeres durante el embarazo, pero igualándose ambos grupos tres meses tras el parto.

Los resultados obtenidos son similares, aunque ligeramente inferiores, especialmente para el estradiol, a los publicados previamente en la literatura en saliva de mujeres embarazadas (Jonsson et al. 1988, Meulenberg & Hofman 1989, Muramatsu & Takaesu 1994, Zaki et al. 1984) y de no embarazadas (Chatterton et al. 2005, Gándara et al. 2007, Gann et al. 2001, Lipson & Ellison 1996, Walker et al. 1979).

Esta menor concentración de hormonas obtenidas en el presente estudio puede ser debida a diferencias en la técnica de análisis empleada. La mayor parte de los estudios se basan en la técnica de radioinmunoanálisis (Chatterton et al. 2005, Darne et al. 1987, Lequin et al. 1986, Lipson & Ellison 1996, Walker et al. 1979, Zaki et al. 1984). En la actualidad se emplean test basados en la determinación inmuno-enzimática (ELISA), sensibles, rápidos y con una buena relación coste-eficacia, que además no requieren un proceso de extracción previo (Gándara et al. 2007, Tallon et al. 1984). Esta ha sido, por tanto la técnica de elección en este estudio.

Otra razón por la cual se pueden haber obtenido valores inferiores de hormonas en saliva a las publicadas en la literatura puede ser la preparación de las muestras para su análisis. En el presente estudio se congelaban las muestras a -20°C (Gann et al. 2001, Meulenberg & Hofman 1989); en el momento de su análisis se descongelaban, se centrifugaban a 3000 rpm y se recogía el sobrenadante para su posterior análisis (Gann et al. 2001). Algunos autores prefieren realizar ese paso antes de la congelación, de tal forma que lo único que conservan es el sobrenadante (Tallon et al. 1984). En este caso,

debido a limitaciones metodológicas fue necesario congelar las muestras de forma inmediata. Por ello, para evitar la repetición del proceso de congelación-descongelación por el potencial riesgo de desnaturalización de las proteínas, se prefirió esperar a la centrifugación al momento del análisis enzimático de las mismas. Sin embargo, Lequin et al. (1986), demostraron que las concentraciones de progesterona en la fase lútea obtenidas a partir de muestras de saliva sonicadas eran entre 2 y 3 veces superiores a las obtenidas a partir de muestras centrifugadas (1000pmol/l frente a 450 pmol/l) (Lequin et al. 1986). Este procesamiento de las muestras puede haber influido también en la obtención de valores inferiores a los descritos en la literatura.

La recolección de la saliva es un procedimiento no invasivo y de bajo coste, por lo que puede ser considerado como el método diagnóstico ideal para la cuantificación de las hormonas esteroideas (Chatterton et al. 2005, Hofman 2001, Kaufman & Lamster 2002, Lequin et al. 1986, Meulenberg & Hofman 1989, Streckfus & Bigler 2002, Walker et al. 1979).

La técnica de recolección de saliva empleada es similar a la descrita previamente por otros autores como Tallon et al. (1984), Gann et al. (2001) y Grau et al. (2002).

El momento de toma de saliva parece ser decisivo a la hora de determinar la concentración de progesterona y estradiol en saliva, y por tanto, la mayor de parte de los autores lo toman entre las 7 y las 11:00h (Gann et al. 2001, Grau et al. 2002, Tallon et al. 1984). Sin embargo, Meulenberg et al. (1989), no encontraron diferencias significativas en la concentración de progesterona de muestras tomadas por la mañana (9 a 10h) y por la tarde (15 a 17h). Walker et al. (1979), encuentran que las muestras tomadas por una mujer a intervalos de dos horas en los días 14, 15, 21 y 22 de su ciclo menstrual, aunque fluctuaban de forma irregular a lo largo del día tanto en la fase periovulatoria como en la fase lútea, la amplitud de estas fluctuaciones era lo suficientemente pequeña como para que no se solaparan los rangos de ambas fases. Por tanto, parece que el momento de toma de la muestra no es tan crítico, a pesar de ello, todas las muestras de saliva fueron recogidas siempre a lo largo de la mañana.

En cuanto al tipo de saliva recogida (estimulada o no estimulada), existe cierta controversia entre los que defienden que no existen diferencias estadísticamente

significativas entre ambas metodologías y que por tanto, los niveles de esteroides en saliva no se ven afectados por la tasa de flujo salival (Ellison & Lipson 1999) y los que encuentran mayores concentraciones de progesterona en muestras de saliva estimuladas (724 pmol/l frente a 984 pmol/l) (Lequin et al. 1986). En este estudio, para conocer la cantidad real de hormonas liberadas sin considerar los momentos de estimulación, se prefirió recoger la saliva total no estimulada.

En cualquier caso, por lo anteriormente comentado, comprobamos como los valores de progesterona y estradiol obtenidos en saliva son lo suficientemente fiables como para permitir emplearlos para establecer una correlación con los cambios observados a nivel clínico.

4.2. Correlación entre cambios clínicos y hormonales

A lo largo de la historia se ha intentado encontrar el “factor” etiológico responsable de la respuesta gingival exagerada durante el embarazo. Por ello se han sugerido la existencia de una potencial correlación entre los elevados niveles hormonales característicos del embarazo y los valores del índice gingival (Hugoson 1971, O’Neil 1979, Zaki et al. 1984, Jonsson et al. 1988, Muramatsu et al. 1994), de tal forma que se demostraría una acción directa de las hormonas en los parámetros clínicos de inflamación.

En este estudio no se ha encontrado ninguna correlación significativa entre el incremento en la severidad de la inflamación gingival y el incremento en los niveles de progesterona o estradiol en saliva durante el embarazo. Estos datos estarían de acuerdo con los resultados aportados por los estudios de O’Neil (1979), sobre los niveles de hormonas en sangre o los de Jonsson et al. (1988) o Muramatsu et al. (1994) que determinan los niveles de hormonas en saliva.

Sin embargo, estarían en contra de los aportados por Hugoson (1971), que encuentra una relación significativa entre el IG y los niveles de hormonales sexuales femeninas (progesterona y estradiol) en plasma ($p<0,001$). Sin embargo, los valores de hormonas que emplean son la resultante de la media ponderada de dos estudios previos

(Schwers 1964, Johansson 1969), por lo que este dato de correlación no puede considerarse como válido.

Parece por tanto que la acción directa de las hormonas sexuales sobre los tejidos periodontales no puede ser demostrada basándose en los resultados de este trabajo, que no nos permiten aportar nuevos datos en este campo, puesto que aunque sí que se ha demostrado que las hormonas aumentan de forma significativa a lo largo del embarazo y lo hacen de forma paralela a los cambios observados en el grado de inflamación gingival, no es posible establecer una correlación estadística entre ambas variables. Estos resultados no implican una falta de asociación entre ambas variables, si no la existencia de múltiples factores involucrados en el desarrollo de esta patología, siendo necesaria la interacción de todos ellos para poder explicarla.

5. Parámetros inmunológicos

En la literatura se ha especulado sobre la potencial influencia de la alteración en la respuesta inmunológica materna durante el embarazo, de tal modo que podría contribuir a una mayor susceptibilidad para desarrollar inflamación gingival (O'Neil 1979; Raber-Durlacher et al. 1991; Lopatin et al. 1980). Según esta hipótesis, como consecuencia de una alteración en el equilibrio huésped-parásito se produciría una respuesta gingival inflamatoria exagerada (los niveles de IP se mantienen durante el embarazo, pero el sistema inmune de la embarazada no es capaz de defenderse frente a ellos de la forma adecuada).

Si a esta baja capacidad de defensa, se añaden los cambios locales en la vascularización gingival (edema) y en el fenotipo gingival (disminución de la barrera epitelial) que aparecen durante el embarazo, el desarrollo de reacciones inflamatorias locales caracterizadas por hiperplasias gingivales se vería favorecido (pseudobolsas).

Dichas pseudobolsas, permitirían la creación de un ambiente anaerobio que favorecería el sobrecrecimiento de determinadas especies bacterianas anaerobias, conocidas por su capacidad para utilizar hormonas sexuales esteroideas como factores de crecimiento (*Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*) (Kornman y Loesche 1982). Dicho estímulo bacteriano induciría una respuesta inflamatoria local que se caracterizaría por niveles elevados de la citoquina proinflamatoria IL-1 β . Dicha citoquina tiene además la capacidad para estimular la producción de PG-E2 que se vería también elevada de forma local (Saito et al. 1990).

Por otro lado, las alteraciones en las poblaciones celulares a nivel sistémico podrían tener un impacto en los niveles de IL-1 β y PGE2 liberados de forma local. Estudios con monocitos periféricos estimulados con LPS e incubados con progesterona y estradiol obtienen niveles elevados de PGE2 y reducidos de IL-1 β (Miyagi et al. 1999, Morishita et al. 1993, Polan et al. 1990), resultados que concuerdan con los obtenidos por El-Attar (1976) y El-Attar et al. (1982) en los que se encuentra un incremento en la producción de PGE2 en biopsias gingivales humanas tras la adición de progesterona y estradiol.

Estas líneas de investigación experimentales nos llevan a plantearnos si a nivel local existirán cambios en el FCG que permitan explicar la manifestación clínica de inflamación gingival característica del embarazo.

Algunos autores han tomado muestras de FCG durante el embarazo para determinar el volumen de FCG (Holm-Pedersen y Løe 1967, Hugoson 1971), la concentración del inhibidor del activador del plasminógeno-2 (PAI-2) (Kinnby et al. 1996) o para evaluar el efecto del raspado y alisado radicular en los niveles de PGE2 (Yalcin et al. 2002b). También existen publicaciones sobre los niveles de IL-1 β y PGE2 medidos de forma transversal en embarazadas en relación con prematuros con bajo peso al nacer (Hasegawa et al. 2003, Konopka et al. 2003) o con la existencia de pre-eclampsia (Canakci et al. 2007). Sin embargo, no existe ningún estudio observacional prospectivo previo que analice los valores de IL-1 β y PGE2 en FCG a lo largo del embarazo y tras el parto en mujeres sin periodontitis.

En este estudio, no se observaron cambios significativos en los niveles de IL-1 β ni en los de PGE2 durante el embarazo. Esto puede ser debido al tamaño muestral seleccionado, que como ya hemos dicho fue calculado empleando el índice gingival como variable principal, por lo que ha terminado siendo reducido para otro tipo de variables.

Se podría especular también que una de las razones por las cuales no se encuentran cambios significativos, a pesar de que sí que se observaron cambios en el grado de inflamación gingival, es el hecho de haber seleccionado una única localización por paciente para cada mediador (surco mesio-vestibular del canino superior derecho para la IL-1 β y del izquierdo para la PGE2), mientras que el grado de inflamación gingival se ha determinado de toda la boca de forma global. Sin embargo, los datos también reflejan un mayor incremento en el grado de inflamación en los sectores anteriores que posteriores, por lo que se puede pensar que los mayores valores de PGE2 e IL-1 β se deberían obtener también en esa zona (Schierano et al. 2008). La técnica ELISA es una técnica cara, por lo que es preciso optimizar su empleo. Se prefirió obtener información de dos mediadores de la inflamación antes que determinar el nivel de uno sólo en varias localizaciones.

Tras el parto en cambio, sí que se encontró una reducción significativa en el nivel de IL-1 β y en la concentración de PGE2, aunque estos datos deben ser interpretados con cautela, puesto que el grupo de mujeres que acuden a la visita de post-parto es inferior al de las mujeres que son seguidas durante todo el embarazo.

5.1. PGE2

La PGE2 es un derivado del ácido araquidónico y un potente vasodilatador. En base a los resultados de estudios realizados *in vitro* (ElAttar 1976, ElAttar et al. 1982, Miyagi et al. 1993), en los que la adición de progesterona y estradiol era capaz de estimular la síntesis de PGE2 tanto de forma local (ElAttar 1976, ElAttar et al. 1982) como sistémica (Miyagi et al. 1993), se ha propuesto que estos potenciales niveles elevados de PGE2 que existirían durante el embarazo serían en parte responsables de la respuesta inflamatoria gingival exagerada, gracias a la acción vasodilatadora de la PGE2 (Garrido de Cabo 1999, Laine 2002, Zachariassen 1993).

En este estudio, los niveles de PGE2 permanecieron constantes durante el embarazo e incluso fueron similares a los obtenidos en el grupo de mujeres no embarazadas. Tras el parto, la cantidad de PGE2 no experimenta tampoco cambios significativos, aunque la concentración se reduce de forma significativa.

Por tanto, estos datos sólo soportan parcialmente la hipótesis propuesta en la literatura que considera que los niveles de PGE2 liberados de forma local pudieran estar involucrados en la patogénesis de la gingivitis gravídica. Sin embargo, no se debe olvidar que debido a problemas técnicos en el laboratorio no se pudieron determinar los niveles de PGE2 de las 42 embarazadas y de las 20 no embarazadas, por lo que, la reducción del tamaño muestral puede haber determinado que los datos obtenidos no hayan sido suficientemente representativos de lo ocurrido.

En cualquier caso, es importante incidir en el hecho de que todos los estudios existentes hasta el momento que afirmaban que una de las potenciales explicaciones de la gingivitis gravídica pudiera ser la elevación local y sistémica de los niveles de PGE2 se basaban siempre en resultados *in vitro* (ElAttar 1976, ElAttar et al. 1982, Miyagi et al. 1993). Sólo existe un estudio clínico que mide de forma longitudinal los niveles de

PGE2 a lo largo del embarazo (Yalcin et al. 2002). Sin embargo, en este estudio todas las gestantes reciben tratamiento periodontal básico (raspado y alisado radicular), aunque no describen si las pacientes presentaban o no periodontitis. Otra crítica frente a este estudio es que no describe las localizaciones seleccionadas para tomar las muestras, ni si los resultados están en cantidad o concentración. Todos estos datos limitan la validez de este estudio e impiden su comparación con el que aquí se describe.

Otros artículos publicados sobre mujeres gestantes han empleado una metodología transversal para diseñar sus estudios. Así encontramos el estudio de Offenbacher et al. (1998), que encuentran una relación significativa inversa entre los niveles de PGE2 y el peso al nacimiento, por lo que proponen que los marcadores bioquímicos del estado periodontal están asociados con un riesgo incremento de prematuros de bajo peso al nacimiento; o el realizado por Konopka et al. (2003), que encuentran niveles elevados de PGE2 en FCG de mujeres que han dado a luz a prematuros con bajo peso al nacer; o el de Canakci et al. (2007) en el que encuentran que los niveles de PGE2 tanto en suero como en FCG son superiores en mujeres con pre-eclampsia que en aquellas normotensas.

Frente a la ausencia de artículos que describan qué es lo que ocurre con los niveles de PGE2 a lo largo del embarazo, se ha optado por su comparación con otros artículos en los que se determinan sus niveles en diferentes estados de salud/enfermedad periodontal (tabla 59).

Autor, año (PGE)	Salud	Gingivitis	Periodontitis
Heasman, 1993	20,5 (7,6) ng/ml	53,5 (5,2) ng/ml	
Nakashima, 1994	2,1 pg 5 ng/ml	4 pg 6 ng/ml	14 pg* 10,5 ng/ml*
Tsai, 1998		1,23 (0,91) pg 9,42 (6,59) ng/ml	86,75 (187,47) pg* 152,20 (243,54) ng/ml*
Heasman, 1998		54,94 (4,06) ng/ml	41,57 (2,91) ng/ml
Seymour, 2001	20,3 ng/ml	49,4 ng/ml	42,3 ng/ml
***		19,46-21,41pg 50,36-69,56ng/ml	

Tabla 59: Comparativa entre los datos de PGE2 en FCG obtenidos en este estudios con los resgistrados en la literatura.

Se observa en la tabla que existe una amplia variación en los resultados de los estudios. A pesar de ello, parece que los niveles de PGE2 de las mujeres de este estudio (gestantes y no gestantes) estarían cercanos a los que presentan sujetos con gingivitis. Por tanto, puede ser posible que los niveles de PGE2 de las muestras de mujeres seleccionadas sean los habitualmente encontrados dentro de la población general, en las que la existencia de una encía “completamente sana” resulta prácticamente imposible (Page y Schroeder 1982).

5.2. *IL-1 β*

La IL-1 β es una citoquina proinflamatoria que juega un papel importante en la inflamación aguda y crónica (Heasman et al. 1993). Es producida fundamentalmente por monocitos activados, macrófagos y fagocitos polimorfonucleares (Heasman et al. 1993). Se ha descrito que es capaz de estimular la síntesis de PGE2 en fibroblastos humanos derivados del ligamento periodontal (Saito et al. 1990).

En este estudio no se han encontrado cambios en los niveles de IL-1 β a lo largo del embarazo, pero sí una reducción significativa tres meses tras el parto. Estos resultados estarían en contra de lo propuesto en los estudios *in vitro* de Polan et al. (1990) y Morishita et al. (1999), los cuales reportaron que la secreción de IL-1 β en monocitos aislados en mujeres en el tercer trimestre del embarazo era inferior al aislado en la fase lútea del ciclo (7UI/ml frente a 52,4 UI/ml) (Polan et al. 1990) y que los linfocitos sanguíneos periféricos estimulados con LPS e incubados con diferentes concentraciones de progesterona (0,2-200 ng/ml) y estradiol (20 ng/ml) suprimían la producción de IL-1 β (Morishita et al. 1999).

En cuanto a ensayos clínicos, existe un estudio clínico randomizado controlado en el que comparaban el raspado y alisado radicular en el segundo trimestre del embarazo con no realizar tratamiento durante el mismo y comprueban el efecto en los niveles de IL-1 β , entre otros marcadores. Encuentran que el tratamiento periodontal reduce los niveles de IL-1 β y esto lo asocian a una reducción en el riesgo de parto prematuro (Offenbacher et al. 2006).

Otros artículos publicados sobre mujeres gestantes con un diseño transversal son los de Konopka et al. (2003) y Hasegawa et al. (2003) en los que encuentran niveles elevados de IL-1 β en suero (Hasegawa et al. 2003) y en FCG (Konopka et al. 2003) de mujeres que han dado a luz a prematuros con bajo peso al nacer; o el de Canakci et al. (2007) en el que encuentran que los niveles de IL-1 β tanto en suero como en FCG son superiores en mujeres con pre-eclampsia que en aquellas normotensas.

Los niveles de IL-1 β obtenidos en nuestro grupo de mujeres embarazadas fueron similares a los descritos en estudios con gingivitis crónica o experimental (Deinzer et al. 2007, Heasman et al. 1993, Johnson et al. 1997, Kinane et al. 1992), como puede comprobarse en la tabla que aparece a continuación.

Autor, año	Salud	Gingivitis	Periodontitis
Kinane, 1992	190 (50) ng/ml	950 (230) ng/ml	
Heasman, 1993	16,5 (9,3)ng/ml	131 (76) ng/ml	
Salvi, 1997	16,8 ng/ml	115,8 ng/ml	263,2 ng/ml
Figueredo, 1999	---	2,9 (3,2) pg	9,0 (5,3) pg*
Rawlison, 2000	0,01 (0,01) ng/ml		0,11 (0,14) ng/ml
Giannopoulou, 2003	6,90 pg	19,5 pg*	43 pg*
Gorska, 2003			
Faizuddin, 2003	13,25 (3,08) pg/ml	72,35 (36,71) pg/ml*	397,5 (296,66) pg/ml*
Orozco, 2006	---	139,10 (26,90) ng/ μ g	241,40 (39,50) ng/ μ g
Yücel, 2008	10,23 pg	23,58 pg	40,66 pg*
	23,80 ng/ml	39,80 ng/ml	20,82 ng/ml
***	23,28-30,45pg; 51,78-85,25ng/ml		

Tabla 60: Comparativa entre los resultados obtenidos para IL-1 en este estudio con los registrados anteriormente en la literatura.

Por tanto y centrándonos en los resultados del presente estudio, si tenemos en cuenta que la primera vez que las mujeres son evaluadas ya se encontraban embarazadas y que además en ese momento ya presentaban tanto un mayor índice gingival como unos niveles mayores y constantes de IL-1 β que las mujeres no embarazadas, en realidad sólo podemos especular sobre la potencial influencia de dicha interleuquina en el desarrollo de la inflamación gingival durante el embarazo.

Nuestros datos sugieren que quizás no exista una acción directa local de las hormonas sexuales sobre la IL-1 β *in vivo*, si no más bien un efecto de las mismas en el medio ambiente local, conocido como un incremento del edema y una hipertrofia de los tejidos.

De esta forma, las hormonas sexuales actuarían de forma indirecta, induciendo la creación y el mantenimiento de un ambiente local adecuado que favorecería el sobrecrecimiento de determinados microorganismos responsables del desencadenamiento de una reacción inmuno-inflamatoria. Cuando tras el parto se reducen los niveles hormonales, y por tanto desaparece el ambiente local favorable para la proliferación bacteriana, también se reducen con ella los mediadores de la inflamación asociados al desarrollo de gingivitis.

5.3. Correlación entre cambios clínicos e inmunológicos

En un intento por encontrar una explicación al incremento en la inflamación gingival durante el embarazo, se propuso como objetivo del estudio determinar la existencia de algún tipo de asociación entre dicho incremento y la potencial alteración que se encontrara en los niveles de IL-1 α y PGE2. Sin embargo, debido a que no se han encontrado cambios en los niveles de ambos mediadores a lo largo del embarazo en el grupo de embarazadas, dicho objetivo no ha podido ser desarrollado.

En base a los estudios de autores tales como Kinane et al. (1992), Heasman et al. (1993) y Johnson et al. (1997) sobre gingivitis experimental se esperaba encontrar un incremento en los niveles de ambos mediadores paralelo al incremento de la inflamación gingival.

Sin embargo, siguiendo otra línea, Gonzales et al. (2001), Yucel et al. (2008) o Bergmann & Deinzer (2008) no son capaces de establecer una asociación entre ambos parámetros.

El mecanismo inmunológico responsable del desarrollo de la inflamación gingival es complejo. En este estudio se han pretendido valorar dos piezas dentro de este

complicado entramado que representa el sistema inmunológico. Será necesario valorar otros mediadores, otras localizaciones y número mayor de pacientes para poder llegar a algún nuevo resultado en este campo.

6. Líneas de investigación futuras

En primer lugar es importante señalar que tras este estudio ha quedado confirmada la existencia de una respuesta gingival exagerada durante el embarazo, sin embargo no ha podido establecerse una asociación con los elevados niveles de progesterona o estradiol encontrados en saliva.

Por otra parte, algunos estudios previos han postulado que los estrógenos pueden tener un efecto antioxidante en los tejidos. La aplicación de estos hallazgos a nivel periodontal puede ser adecuada en el caso de las enfermedades periodontales en las que se liberan una gran cantidad de radicales libres de forma local, especialmente en aquellas que afectan a pacientes fumadores. Fruto de estas ideas se propuso un modelo experimental con el cual se pretendía evaluar el papel de los fitoestrógenos, un tipo de esteroides naturales, con los mismos efectos beneficiosos que las hormonas esteroideas (estrógenos) pero sin tener asociados efectos perjudiciales tales como inducir la aparición de caracteres sexuales secundarios (**Parte II**). Este modelo pretende ser la base para una línea de investigación futura en la que, en base a los resultados obtenidos, se propongan nuevos mecanismos coadyuvantes en el tratamiento de la patología periodontal.

En segundo lugar, no se han encontrado cambios significativos en los niveles de IL-1 β y PGE2 a lo largo del embarazo, aunque bien es cierto, que los valores de IL-1 β fueron superiores en mujeres embarazadas. Resultaría interesante en este punto poder realizar un estudio con un mayor tamaño muestral que permita confirmar o refutar los resultados aquí obtenidos. El campo de la inmunología es extenso y complejo. El intento de simplificación realizado seleccionando sólo dos mediadores de la inflamación puede no haber sido una decisión acertada, pero en cualquier caso eran necesarios estudios en los que se observara qué es lo que sucedía durante el desarrollo de la gingivitis gravídica desde un punto de vista inmunológico. Este es el primer estudio que se centra en este aspecto, por lo que nos sirve para establecer futuras líneas de investigación, explorando nuevos mediadores y seleccionando nuevas localizaciones en base a los resultados aquí obtenidos.

En tercer lugar, considerando que en los últimos años la medicina periodontal está experimentando un gran auge, sería interesante determinar si estos cambios asociados a la gingivitis gravídica pueden tener alguna repercusión en la aparición de parto prematuro o recién nacidos de bajo peso al nacer. Se ha propuesto que la elevación en los niveles de mediadores de la inflamación como consecuencia de una reacción inmuno-inflamatoria local pueden desencadenar cualquiera de estas dos patologías (Madianos et al. 2002, Khader et al. 2005, Kinane et al. 2008). Sería por ello interesante estudiar la posible repercusión sistémica de la situación periodontal durante el embarazo.

Capítulo VI.

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en este estudio, se puede concluir que:

1. A lo largo del embarazo se observa un incremento en la reactividad gingival frente a la placa, siendo este incremento más marcado en los dientes anteriores y en las localizaciones interproximales.
2. Los niveles de progesterona y estradiol en saliva siguen un patrón similar al descrito en plasma, con un incremento gradual a lo largo del embarazo y una caída brusca tres meses tras el parto; sin embargo, no se encuentran correlaciones significativas entre el incremento en el grado inflamación gingival y el aumento en los niveles de ambas hormonas.
3. No se observan cambios significativos en los niveles de IL-1 β y PGE2 a lo largo del embarazo y por tanto tampoco es posible establecer correlaciones con los cambios en el grado de inflamación gingival.
4. Las mujeres embarazadas poseen mayor severidad y extensión de la inflamación gingival, mayor reactividad frente a la placa y mayores niveles de IL-1 β en FCG que las mujeres no embarazadas.
5. Tres meses tras el parto se mantienen las diferencias con las mujeres no embarazadas en cuanto a la extensión de la severidad de la inflamación gingival y los niveles de IL-1 β en FCG. Sin embargo, desaparece la diferencia en el grado de reactividad gingival frente a la placa.
6. Son necesarios más estudios en esta línea de investigación que confirmen los resultados aquí presentados.

Capítulo VII.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, F., van der Velden, U., Moorer, W.R., Everts, V., Vroom, T.M. & Scholte, G. (1986) Experimental gingivitis in relation to susceptibility to periodontal disease. II. Phase-contrast microbiological features and some host-response observations. *J Clin Periodontol* 13, 551-557.
- Albandar, J.M. (2002) Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. *Periodontol 2000* 29, 177-206.
- Albandar, J.M. & Kingman, A. (1999) Gingival recession, gingival bleeding, and dental calculus in adults 30 years of age and older in the United States, 1988-1994. *J Periodontol* 70, 30-43.
- Alpagot, T., Remien, J., Bhattacharyya, M., Konopka, K., Lundergan, W. & Duzgunes, N. (2007) Longitudinal evaluation of prostaglandin E2 (PGE2) and periodontal status in HIV+ patients. *Arch Oral Biol* 52, 1102-1108.
- Amar, S. & Chung, K.M. (1994) Influence of hormonal variation on the periodontium in women. *Periodontol 2000* 6, 79-87.
- Arafat, A.H. (1974) Periodontal status during pregnancy. *J Periodontol* 45, 641-643.
- Barendregt, D.S., Van der Velden, U., Timmerman, M.F. & van der Weijden, G.A. (2006) Comparison of two automated periodontal probes and two probes with a conventional readout in periodontal maintenance patients. *J Clin Periodontol* 33, 276-282.
- Beck, J.D. & Loe, H. (1993) Epidemiological principles in studying periodontal diseases. *Periodontol 2000* 2, 34-45.
- Bergmann, A. & Deinzer, R. (2008) Daytime variations of interleukin-1beta in gingival crevicular fluid. *Eur J Oral Sci* 116, 18-22.
- Bergstrom, J. (2003) Tobacco smoking and risk for periodontal disease. *J Clin Periodontol* 30, 107-113.
- Brill, N. & Krasse, B. (1958) The passage of tissue fluid into the clinically health gingival pocket. *Acta Odontol Scand* 16, 233-245.
- Burt, B. (2005) Position paper: epidemiology of periodontal diseases. *J Periodontol* 76, 1406-1419.
- Calatayud, J. & Martín, G. (2002) Bioestadística en la investigación odontológica. Ed. Pues SL.
- Canakci, V., Canakci, C.F., Yildirim, A., Ingec, M., Eltas, A. & Erturk, A. (2007) Periodontal disease increases the risk of severe pre-eclampsia among pregnant women. *J Clin Periodontol* 34, 639-645.

- Chaikin, B.S. (1977) Incidence of gingivitis in pregnancy. *Quintessence Int Dent Dig* 8, 81-89.
- Champagne, C.M., Buchanan, W., Reddy, M.S., Preisser, J.S., Beck, J.D. & Offenbacher, S. (2003) Potential for gingival crevice fluid measures as predictors of risk for periodontal diseases. *Periodontol* 2000 31, 167-180.
- Chapple, I.L., Cross, I.A., Glenwright, H.D. & Matthews, J.B. (1995) Calibration and reliability of the Periotron 6000 for individual gingival crevicular fluid samples. *J Periodontal Res* 30, 73-79.
- Chapple, I.L., Landini, G., Griffiths, G.S., Patel, N.C. & Ward, R.S. (1999) Calibration of the Periotron 8000 and 6000 by polynomial regression. *J Periodontal Res* 34, 79-86.
- Charon, J.A., Luger, T.A., Mergenhausen, S.E. & Oppenheim, J.J. (1982) Increased thymocyte-activating factor in human gingival fluid during gingival inflammation. *Infect Immun* 38, 1190-1195.
- Chatterton, R.T., Jr., Mateo, E.T., Hou, N., Rademaker, A.W., Acharya, S., Jordan, V.C. & Morrow, M. (2005) Characteristics of salivary profiles of oestradiol and progesterone in premenopausal women. *J Endocrinol* 186, 77-84.
- Christoffers, A.B., Kreisler, M. & Willershausen, B. (2003) Effects of estradiol and progesterone on the proliferation of human gingival fibroblasts. *Eur J Med Res* 8, 535-542.
- Ciantar, M. & Caruana, D.J. (1998) Periotron 8000: calibration characteristics and reliability. *J Periodontal Res* 33, 259-264.
- Cohen, D.W., Friedman, L., Shapiro, J. & Kyle, G.C. (1969) A longitudinal investigation of the periodontal changes during pregnancy. *J Periodontol* 40, 563-570.
- Cohen, D.W., Shapiro, J., Friedman, L., Kyle, G.C. & Franklin, S. (1971) A longitudinal investigation of the periodontal changes during pregnancy and fifteen months post-partum. II. *J Periodontol* 42, 653-657.
- Conde Vidal J, I.C.M., Roldán G (1981) Enfermedad parodontal en el embarazo. *Revista Española de Estomatología* 29, 179-190.
- Cunningham, F., Leveo, K., Hauth, J. & Gilstrap, L. (2006) *Obstetricia de Williams*. Ed. McGraw-Hill.
- D'Aoust, P. & Landry, R.G. (1994) The effect of supragingival plaque on crevicular fluid measurements. *Int Dent J* 44, 159-164.

- Darne, J., McGarrigle, H.H. & Lachelin, G.C. (1987) Saliva oestriol, oestradiol, oestrone and progesterone levels in pregnancy: spontaneous labour at term is preceded by a rise in the saliva oestriol:progesterone ratio. *Br J Obstet Gynaecol* 94, 227-235.
- Deasy, M.J., Grota, L.J. & Kennedy, J.E. (1972) The effect of estrogen, progesterone and cortisol on gingival inflammation. *J Periodontal Res* 7, 111-124.
- Deinzer, R., Waschul, B. & Herforth, A. (2004) Effects of experimental gingivitis on crevicular PGE2 in a split mouth trial. *J Clin Periodontol* 31, 501-505.
- Deinzer, R., Weik, U., Kolb-Bachofen, V. & Herforth, A. (2007) Comparison of experimental gingivitis with persistent gingivitis: differences in clinical parameters and cytokine concentrations. *J Periodontal Res* 42, 318-324.
- Delaleu, N. & Bickel, M. (2004) Interleukin-1 beta and interleukin-18: regulation and activity in local inflammation. *Periodontol* 2000 35, 42-52.
- Delaney, J.E., Ratzan, S.K. & Kornman, K.S. (1986) Subgingival microbiota associated with puberty: studies of pre-, circum-, and postpubertal human females. *Pediatr Dent* 8, 268-275.
- Delgado, M. & Doménech, J.M. (2009) Fundamentos de Diseño y estadística. D 8. Investigación científica: diseño de estudios. 10ª ed. Barcelona: Signo.
- Eiselt, P. (1840) Gingival hypertrophy during pregnancy. *Med Jahrb Osterr Staates* 21, 560.
- el-Attar, T.M., Roth, G.D. & Hugoson, A. (1973) Comparative metabolism of 4- 14 C- progesterone in normal and chronically inflamed human gingival tissue. *J Periodontal Res* 8, 79-85.
- ElAttar, T.M. (1976) Prostaglandin E2 in human gingiva in health and disease and its stimulation by female sex steroids. *Prostaglandins* 11, 331-341.
- ElAttar, T.M. & Hugoson, A. (1974) Comparative metabolism of female sex steroids in normal and chronically inflamed gingiva of the dog. *J Periodontal Res* 9, 284-289.
- ElAttar, T.M., Lin, H.S. & Tira, D.E. (1982) The relationship between the concentration of female sex steroids and prostaglandins production by human gingiva in vitro. *Prostaglandins Leukot Med* 8, 447-458.
- Ellison, P.T. & Lipson, S.F. (1999) Salivary estradiol--a viable alternative? *Fertil Steril* 72, 951-952.

- Faizuddin, M., Bharathi, S.H. & Rohini, N.V. (2003) Estimation of interleukin-1beta levels in the gingival crevicular fluid in health and in inflammatory periodontal disease. *J Periodontal Res* 38, 111-114.
- Figueredo, C.M., Ribeiro, M.S., Fischer, R.G. & Gustafsson, A. (1999) Increased interleukin-1beta concentration in gingival crevicular fluid as a characteristic of periodontitis. *J Periodontol* 70, 1457-1463.
- Flemmig, T.F. (1999) Periodontitis. *Ann Periodontol* 4, 32-38.
- Fontana, V.A. (2008) Citoquinas: el lenguaje del diálogo materno-embrionario. *Revista QuímicaViva* 2, 80-101.
- Fransson, C., Mooney, J., Kinane, D.F. & Berglundh, T. (1999) Differences in the inflammatory response in young and old human subjects during the course of experimental gingivitis. *J Clin Periodontol* 26, 453-460.
- Gándara, B.K., Leresche, L. & Mancel, L. (2007) Patterns of salivary estradiol and progesterone across the menstrual cycle. *Ann N Y Acad Sci* 1098, 446-450.
- Gani, F., Braidia, A., Lombardi, C., Del Giudice, A., Senna, G.E. & Passalacqua, G. (2003) Rhinitis in pregnancy. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 35, 306-313.
- Gann, P.H., Giovanazzi, S., Van Horn, L., Branning, A. & Chatterton, R.T., Jr. (2001) Saliva as a medium for investigating intra- and interindividual differences in sex hormone levels in premenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10, 59-64.
- Garrido de Cabo N, B.C.J., Ramos Barbosa I. (1999) Enfermedad periodontal y embarazo. *Periodoncia* 9, 31-40.
- Giannopoulou, C., Kamma, J.J. & Mombelli, A. (2003) Effect of inflammation, smoking and stress on gingival crevicular fluid cytokine level. *J Clin Periodontol* 30, 145-153.
- Gibbons, R.J. & Macdonald, J.B. (1960) Hemin and vitamin K compounds as required factors for the cultivation of certain strains of *Bacteroides melaninogenicus*. *J Bacteriol* 80, 164-170.
- Gibbs, C.H., Hirschfeld, J.W., Lee, J.G., Low, S.B., Magnusson, I., Thousand, R.R., Yerneni, P. & Clark, W.B. (1988) Description and clinical evaluation of a new computerized periodontal probe--the Florida probe. *J Clin Periodontol* 15, 137-144.
- Gonzales, J.R., Herrmann, J.M., Boedeker, R.H., Francz, P.I., Biesalski, H. & Meyle, J. (2001) Concentration of interleukin-1beta and neutrophil elastase activity in

- gingival crevicular fluid during experimental gingivitis. *J Clin Periodontol* 28, 544-549.
- González-Merlo, J., Lailla Vicens, J., Fabre González, E. & González Bosquet, E. (2006) *Obstetricia* 5ª edición Masson Barcelona.
- Goodson, J.M., Dewhirst, F.E. & Brunetti, A. (1974) Prostaglandin E2 levels and human periodontal disease. *Prostaglandins* 6, 81-85.
- Grau, D.M., Silvestre, F.J., Miralles, L. & Roig, J.M. (2002) La secreción salival durante el embarazo. *Revista Europea de Odonto-Estomatología* XIV, 93-98.
- Griffiths, G.S. (2003) Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. *Periodontol* 2000 31, 32-42.
- Griffiths, G.S., Wilton, J.M. & Curtis, M.A. (1992) Contamination of human gingival crevicular fluid by plaque and saliva. *Arch Oral Biol* 37, 559-564.
- Guncu, G.N., Tozum, T.F. & Caglayan, F. (2005) Effects of endogenous sex hormones on the periodontium--review of literature. *Aust Dent J* 50, 138-145.
- Gursoy, M., Pajukanta, R., Sorsa, T. & Kononen, E. (2008) Clinical changes in periodontium during pregnancy and post-partum. *J Clin Periodontol* 35, 576-583.
- Gusberti, F.A., Mombelli, A., Lang, N.P. & Minder, C.E. (1990) Changes in subgingival microbiota during puberty. A 4-year longitudinal study. *J Clin Periodontol* 17, 685-692.
- Gutiérrez, A., Donato, R.M. & Mindlin, A.D. (2006) Aspectos inmunológicos del embarazo normal. *Archivos de alergia e inmunología clínica* 37, 92-95.
- Haffajee, A.D., Socransky, S.S. & Goodson, J.M. (1983) Clinical parameters as predictors of destructive periodontal disease activity. *J Clin Periodontol* 10, 257-265.
- Haffajee, A.D., Socransky, S.S., Patel, M.R. & Song, X. (2008) Microbial complexes in supragingival plaque. *Oral Microbiol Immunol* 23, 196-205.
- Hasegawa, K., Furuichi, Y., Shimotsu, A., Nakamura, M., Yoshinaga, M., Kamitomo, M., Hatae, M., Maruyama, I. & Izumi, Y. (2003) Associations between systemic status, periodontal status, serum cytokine levels, and delivery outcomes in pregnant women with a diagnosis of threatened premature labor. *J Periodontol* 74, 1764-1770.
- Heasman, P.A., Collins, J.G. & Offenbacher, S. (1993) Changes in crevicular fluid levels of interleukin-1 beta, leukotriene B4, prostaglandin E2, thromboxane B2

- and tumour necrosis factor alpha in experimental gingivitis in humans. *J Periodontol Res* 28, 241-247.
- Hofman, L.F. (2001) Human saliva as a diagnostic specimen. *J Nutr* 131, 1621S-1625S.
- Holm-Pedersen, P. & Loe, H. (1967) Flow of gingival exudate as related to menstruation and pregnancy. *J Periodontol Res* 2, 13-20.
- Holmes, L.G. & Elattar, T.M. (1977) Gingival inflammation assessed by histology, 3H-estrone metabolism and prostaglandin E2 levels. *J Periodontol Res* 12, 500-509.
- Holmstrup, P. (1999) Non-plaque-induced gingival lesions. *Ann Periodontol* 4, 20-31.
- Hugoson, A. (1970) Gingival inflammation and female sex hormones. A clinical investigation of pregnant women and experimental studies in dogs. *J Periodontol Res Suppl* 5, 1-18.
- Hugoson, A. (1971) Gingivitis in pregnant women. A longitudinal clinical study. *Odontol Revy* 22, 65-84.
- Hugoson, A. & Norderyd, O. (2008) Has the prevalence of periodontitis changed during the last 30 years? *J Clin Periodontol* 35, 338-345.
- Hugoson, A., Sjodin, B. & Norderyd, O. (2008) Trends over 30 years, 1973-2003, in the prevalence and severity of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 35, 405-414.
- Iglesias, M., Guzmán, R., Martínez, O., Restrep, J. & Iglesias, A. (2002) Inmunología de la reproducción. *Acta Med Colomb* 27, 170-180.
- Ishihara, Y., Nishihara, T., Kuroyanagi, T., Shirozu, N., Yamagishi, E., Ohguchi, M., Koide, M., Ueda, N., Amano, K. & Noguchi, T. (1997) Gingival crevicular interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist levels in periodontally healthy and diseased sites. *J Periodontol Res* 32, 524-529.
- Jensen, J., Liljemark, W. & Bloomquist, C. (1981) The effect of female sex hormones on subgingival plaque. *J Periodontol* 52, 599-602.
- Johansson, E.D.B. (1969) Plasma progesterone levels during ovulation and the luteal phase of the menstrual cycle during pregnancy, measured by a rapid competitive protein binding technique. *Acta Univeristatis Upsaliensis*. Thesis.
- Johnson, T.C., Reinhardt, R.A., Payne, J.B., Dyer, J.K. & Patil, K.D. (1997) Experimental gingivitis in periodontitis-susceptible subjects. *J Clin Periodontol* 24, 618-625.
- Jonsson, D., Wahlin, A., Idvall, I., Johnsson, I., Bratthall, G. & Nilsson, B.O. (2005) Differential effects of estrogen on DNA synthesis in human periodontal ligament and breast cancer cells. *J Periodontol Res* 40, 401-406.

- Jonsson, R., Howland, B.E. & Bowden, G.H. (1988) Relationships between periodontal health, salivary steroids, and *Bacteroides intermedius* in males, pregnant and non-pregnant women. *J Dent Res* 67, 1062-1069.
- Katz, F.H. & Shannon, I.L. (1964) Identification and Significance of Parotid Fluid Corticosteroids. *Acta Endocrinol (Copenh)* 46, 393-404.
- Kaufman, E. & Lamster, I.B. (2002) The diagnostic applications of saliva--a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 13, 197-212.
- Kawahara, K. & Shimazu, A. (2003) Expression and intracellular localization of progesterone receptors in cultured human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res* 38, 242-246.
- Kinane, D.F. (2001) Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol* 2000 25, 8-20.
- Kinane, D.F., Winstanley, F.P., Adonogianaki, E. & Moughal, N.A. (1992) Bioassay of interleukin 1 (IL-1) in human gingival crevicular fluid during experimental gingivitis. *Arch Oral Biol* 37, 153-156.
- Kinnby, B., Matsson, L. & Astedt, B. (1996) Aggravation of gingival inflammatory symptoms during pregnancy associated with the concentration of plasminogen activator inhibitor type 2 (PAI-2) in gingival fluid. *J Periodontal Res* 31, 271-277.
- Kolenbrander, P.E., Palmer, R.J., Jr., Rickard, A.H., Jakubovics, N.S., Chalmers, N.I. & Diaz, P.I. (2006) Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol* 2000 42, 47-79.
- Konopka, T., Rutkowska, M., Hirnle, L., Kopec, W. & Karolewska, E. (2003) The secretion of prostaglandin E2 and interleukin 1-beta in women with periodontal diseases and preterm low-birth-weight. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol* 45, 18-28.
- Kornman, K.S. & Loesche, W.J. (1980) The subgingival microbial flora during pregnancy. *J Periodontal Res* 15, 111-122.
- Kornman, K.S. & Loesche, W.J. (1982) Effects of estradiol and progesterone on *Bacteroides melaninogenicus* and *Bacteroides gingivalis*. *Infect Immun* 35, 256-263.
- Kornman, K.S., Page, R.C. & Tonetti, M.S. (1997) The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol* 2000 14, 33-53.

- Kundu, N., Novak, N. & Petersen, L.P. (1983) Salivary unconjugated estriol levels in normal third trimester pregnancy - direct correlation with serum levels. *Steroids* 41, 145-153.
- Laine, M.A. (2002) Effect of pregnancy on periodontal and dental health. *Acta Odontol Scand* 60, 257-264.
- Lamster, I.B. & Ahlo, J.K. (2007) Analysis of gingival crevicular fluid as applied to the diagnosis of oral and systemic diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1098, 216-229.
- Lamster, I.B. & Novak, M.J. (1992) Host mediators in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 3, 31-60.
- Lang, N.P., Nyman, S., Senn, C. & Joss, A. (1991) Bleeding on probing as it relates to probing pressure and gingival health. *J Clin Periodontol* 18, 257-261.
- Lapp, C.A. & Lapp, D.F. (2005) Analysis of interleukin-activated human gingival fibroblasts: modulation of chemokine responses by female hormones. *J Periodontol* 76, 803-812.
- Lequin, R.M., van den Boogaard, A., Vermeulen, J. & Danhof, M. (1986) Progesterone in saliva: pitfalls and consequent implications for accuracy of the determination. *Clin Chem* 32, 831-834.
- Li, J., Helmerhorst, E.J., Leone, C.W., Troxler, R.F., Yaskell, T., Haffajee, A.D., Socransky, S.S. & Oppenheim, F.G. (2004) Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol* 97, 1311-1318.
- Lieff, S., Boggess, K.A., Murtha, A.P., Jared, H., Madianos, P.N., Moss, K., Beck, J. & Offenbacher, S. (2004) The oral conditions and pregnancy study: periodontal status of a cohort of pregnant women. *J Periodontol* 75, 116-126.
- Lindhe, J. & Attstrom, R. (1967) Gingival exudation during the menstrual cycle. *J Periodontol Res* 2, 194-198.
- Lindhe, J., Attstrom, R. & Bjorn, A.L. (1968a) Influence of sex hormones on gingival exudation in dogs with chronic gingivitis. *J Periodontol Res* 3, 279-283.
- Lindhe, J., Attstrom, R. & Bjorn, A.L. (1968b) Influence of sex hormones on gingival exudation in gingivitis-free female dogs. *J Periodontol Res* 3, 273-278.
- Lindhe, J., Attstrom, R. & Bjorn, A.L. (1969) The influence of progestogen on gingival exudation during menstrual cycles. A longitudinal study. *J Periodontol Res* 4, 97-102.

- Lindhe, J. & Branemark, P.I. (1967a) Changes in microcirculation after local application of sex hormones. *J Periodontal Res* 2, 185-193.
- Lindhe, J. & Branemark, P.I. (1967b) Changes in vascular permeability after local application of sex hormones. *J Periodontal Res* 2, 259-265.
- Lindhe, J. & Branemark, P.I. (1968a) Experimental studies on the etiology of pregnancy gingivitis. *Periodontal Abstr* 16, 50-51.
- Lindhe, J. & Branemark, P.I. (1968b) The effects of sex hormones on vascularization of granulation tissue. *J Periodontal Res* 3, 6-11.
- Lindhe, J., Branemark, P.I. & Lundskog, J. (1967) Changes in vascular proliferation after local application of sex hormones. *J Periodontal Res* 2, 266-272.
- Lindhe, J. & Sonesson, B. (1967) Effect of sex hormones on inflammation. *J Periodontal Res* 2, 7-12.
- Lipson, S.F. & Ellison, P.T. (1996) Comparison of salivary steroid profiles in naturally occurring conception and non-conception cycles. *Hum Reprod* 11, 2090-2096.
- Löe (1965) Periodontal changes in pregnancy. *J Periodontol* 36, 209-217.
- Loe, H. (1967) The Gingival Index, the Plaque Index and the Retention Index Systems. *J Periodontol* 38, Suppl:610-616.
- Loe, H. & Silness, J. (1963) Periodontal Disease in Pregnancy. I. Prevalence and Severity. *Acta Odontol Scand* 21, 533-551.
- Loe, H., Theilade, E. & Jensen, S.B. (1965) Experimental Gingivitis in Man. *J Periodontol* 36, 177-187.
- Loe, H., Theilade, E., Jensen, S.B. & Schiott, C.R. (1967) Experimental gingivitis in man. 3. Influence of antibiotics on gingival plaque development. *J Periodontal Res* 2, 282-289.
- Lopatin, D.E., Kornman, K.S. & Loesche, W.J. (1980) Modulation of immunoreactivity to periodontal disease-associated microorganisms during pregnancy. *Infect Immun* 28, 713-718.
- López-Jornet, P. & Bermejo-Fenoll, A. (1996) Disorders of secretion: hiposecretion and sialorrhea. *Med Oral* 1, 96-106.
- Lundgren, D. & Lindhe, J. (1971) Lack of influence of female sex hormones on alveolar bone loss in hamsters. *Scand J Dent Res* 79, 113-118.
- Machtei, E.E., Mahler, D., Sanduri, H. & Peled, M. (2004) The effect of menstrual cycle on periodontal health. *J Periodontol* 75, 408-412.

- Machuca, G., Khoshfeiz, O., Lacalle, J.R., Machuca, C. & Bullon, P. (1999) The influence of general health and socio-cultural variables on the periodontal condition of pregnant women. *J Periodontol* 70, 779-785.
- Maier, A.W. & Orban, B. (1949) Gingivitis in pregnancy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 2, 334-373.
- Mariotti, A. (1991) The effects of estrogen on gingival fibroblast proliferation. *J Dent Res* 70, 352.
- Mariotti, A. (1994) Sex steroid hormones and cell dynamics in the periodontium. *Crit Rev Oral Biol Med* 5, 27-53.
- Mariotti, A. (1999) Dental plaque-induced gingival diseases. *Ann Periodontol* 4, 7-19.
- Mariotti, A.J. (2005) Estrogen and extracellular matrix influence human gingival fibroblast proliferation and protein production. *J Periodontol* 76, 1391-1397.
- Mariotti, V., Marconi, A.M. & Pardi, G. (2004) Undesired effects of steroids during pregnancy. *J Matern Fetal Neonatal Med* 16 Suppl 2, 5-7.
- Maroto de Agustín, A., Moreno Bueno, M., Rubio Moreno, M., C., O.V. & Escobar Rabadán, F. (1998) Conocimiento y uso de métodos anticonceptivos por la población femenina de una zona de salud. *Revista española de Salud Pública* 72, 547-557.
- Marsh, P.D. (2004) Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res* 38, 204-211.
- Masada, M.P., Persson, R., Kenney, J.S., Lee, S.W., Page, R.C. & Allison, A.C. (1990) Measurement of interleukin-1 alpha and -1 beta in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res* 25, 156-163.
- McGuire, M.K. & Nunn, M.E. (1999) Prognosis versus actual outcome. IV. The effectiveness of clinical parameters and IL-1 genotype in accurately predicting prognoses and tooth survival. *J Periodontol* 70, 49-56.
- Mealey, B.L. & Moritz, A.J. (2003) Hormonal influences: effects of diabetes mellitus and endogenous female sex steroid hormones on the periodontium. *Periodontol* 2000 32, 59-81.
- Meulenberg, P.M. & Hofman, J.A. (1989) Salivary progesterone excellently reflects free and total progesterone in plasma during pregnancy. *Clin Chem* 35, 168-172.
- Miyagi, M., Morishita, M. & Iwamoto, Y. (1993) Effects of sex hormones on production of prostaglandin E2 by human peripheral monocytes. *J Periodontol* 64, 1075-1078.

- Miyazaki, H., Yamashita, Y., Shirahama, R., Goto-Kimura, K., Shimada, N., Sogame, A. & Takehara, T. (1991) Periodontal condition of pregnant women assessed by CPITN. *J Clin Periodontol* 18, 751-754.
- Mohamed, A.H., Waterhouse, J.P. & Friederici, H.H. (1974) The microvasculature of the rabbit gingiva as affected by progesterone: an ultrastructural study. *J Periodontol* 45, 50-60.
- Mombelli, A., Lang, N.P., Burgin, W.B. & Gusberti, F.A. (1990) Microbial changes associated with the development of puberty gingivitis. *J Periodontal Res* 25, 331-338.
- Monash, S. (1926) Proliferative gingivitis of pregnancy. *Surgery, Gynecology and Obstetrics* 42, 794.
- Morishita, M., Miyagi, M. & Iwamoto, Y. (1999) Effects of sex hormones on production of interleukin-1 by human peripheral monocytes. *J Periodontol* 70, 757-760.
- Mullally, B.H., Coulter, W.A., Hutchinson, J.D. & Clarke, H.A. (2007) Current oral contraceptive status and periodontitis in young adults. *J Periodontol* 78, 1031-1036.
- Muramatsu, Y. & Takaesu, Y. (1994) Oral health status related to subgingival bacterial flora and sex hormones in saliva during pregnancy. *Bull Tokyo Dent Coll* 35, 139-151.
- Nakagawa, S., Fujii, H., Machida, Y. & Okuda, K. (1994) A longitudinal study from prepuberty to puberty of gingivitis. Correlation between the occurrence of *Prevotella intermedia* and sex hormones. *J Clin Periodontol* 21, 658-665.
- Nakashima, K., Roehrich, N. & Cimasoni, G. (1994) Osteocalcin, prostaglandin E2 and alkaline phosphatase in gingival crevicular fluid: their relations to periodontal status. *J Clin Periodontol* 21, 327-333.
- Navazesh, M. (1993) Methods for collecting saliva. *Ann N Y Acad Sci* 694, 72-77.
- Nelson, S.L., Hynd, B.A. & Pickrum, H.M. (1992) Automated enzyme immunoassay to measure prostaglandin E2 in gingival crevicular fluid. *J Periodontal Res* 27, 143-148.
- Nyvad, B. & Kilian, M. (1987) Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scand J Dent Res* 95, 369-380.
- O'Neil, T.C. (1979a) Maternal T-lymphocyte response and gingivitis in pregnancy. *J Periodontol* 50, 178-184.

- O'Neil, T.C. (1979b) Plasma female sex-hormone levels and gingivitis in pregnancy. *J Periodontol* 50, 279-282.
- Offenbacher, S., Collins, J.G. & Heasman, P.A. (1993) Diagnostic potential of host response mediators. *Adv Dent Res* 7, 175-181.
- Offenbacher, S., Farr, D.H. & Goodson, J.M. (1981) Measurement of prostaglandin E in crevicular fluid. *J Clin Periodontol* 8, 359-367.
- Offenbacher, S., Jared, H.L., O'Reilly, P.G., Wells, S.R., Salvi, G.E., Lawrence, H.P., Socransky, S.S. & Beck, J.D. (1998) Potential pathogenic mechanisms of periodontitis associated pregnancy complications. *Ann Periodontol* 3, 233-250.
- Offenbacher, S., Lin, D., Strauss, R., McKaig, R., Irving, J., Barros, S.P., Moss, K., Barrow, D.A., Hefti, A. & Beck, J.D. (2006) Effects of periodontal therapy during pregnancy on periodontal status, biologic parameters, and pregnancy outcomes: a pilot study. *J Periodontol* 77, 2011-2024.
- Offenbacher, S., Odle, B.M. & Van Dyke, T.E. (1986) The use of crevicular fluid prostaglandin E₂ levels as a predictor of periodontal attachment loss. *J Periodontal Res* 21, 101-112.
- Ojanotko-Harri, A. (1985) Metabolism of progesterone by healthy and inflamed human gingiva in vitro. *J Steroid Biochem* 23, 1031-1035.
- Ojanotko-Harri, A.O., Harri, M.P., Hurttia, H.M. & Sewon, L.A. (1991) Altered tissue metabolism of progesterone in pregnancy gingivitis and granuloma. *J Clin Periodontol* 18, 262-266.
- Oliver, R.C., Brown, L.J. & Loe, H. (1998) Periodontal diseases in the United States population. *J Periodontol* 69, 269-278.
- Orozco, A., Gemmell, E., Bickel, M. & Seymour, G.J. (2006) Interleukin-1beta, interleukin-12 and interleukin-18 levels in gingival fluid and serum of patients with gingivitis and periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 21, 256-260.
- Pack, A.R. & Thomson, M.E. (1980) Effects of topical and systemic folic acid supplementation on gingivitis in pregnancy. *J Clin Periodontol* 7, 402-414.
- Page, R.C. (1986) Gingivitis. *J Clin Periodontol* 13, 345-359.
- Page, R.C. & Schroeder, H.E. (1976) Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest* 34, 235-249.
- Parkar, M.H., Newman, H.N. & Olsen, I. (1996) Polymerase chain reaction analysis of oestrogen and androgen receptor expression in human gingival and periodontal tissue. *Arch Oral Biol* 41, 979-983.

- Pinard, A. (1877) Gingivitis in pregnancy. *Dent Regist* 31, 258-259.
- Polan, M.L., Kuo, A., Loukides, J. & Bottomly, K. (1990) Cultured human luteal peripheral monocytes secrete increased levels of interleukin-1. *J Clin Endocrinol Metab* 70, 480-484.
- Preshaw, P.M., Kelly, P.J. & Heasman, P.A. (1996) Quadratic calibration curves for the Periotron 6000. *J Periodontal Res* 31, 441-443.
- Preshaw, P.M., Knutsen, M.A. & Mariotti, A. (2001) Experimental gingivitis in women using oral contraceptives. *J Dent Res* 80, 2011-2015.
- Raber-Durlacher, J.E., Leene, W., Palmer-Bouva, C.C., Raber, J. & Abraham-Inpijn, L. (1993) Experimental gingivitis during pregnancy and post-partum: immunohistochemical aspects. *J Periodontol* 64, 211-218.
- Raber-Durlacher, J.E., van Steenberg, T.J., Van der Velden, U., de Graaff, J. & Abraham-Inpijn, L. (1994) Experimental gingivitis during pregnancy and post-partum: clinical, endocrinological, and microbiological aspects. *J Clin Periodontol* 21, 549-558.
- Raber-Durlacher, J.E., Zeijlemaker, W.P., Meinesz, A.A. & Abraham-Inpijn, L. (1991) CD4 to CD8 ratio and in vitro lymphoproliferative responses during experimental gingivitis in pregnancy and post-partum. *J Periodontol* 62, 663-667.
- Rawlinson, A., Dalati, M.H., Rahman, S., Walsh, T.F. & Fairclough, A.L. (2000) Interleukin-1 and IL-1 receptor antagonist in gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol* 27, 738-743.
- Reynolds, M.A., Aberdeen, G.W., Pepe, G.J., Sauk, J.J. & Albrecht, E.D. (2004) Estrogen suppression induces papillary gingival overgrowth in pregnant baboons. *J Periodontol* 75, 693-701.
- Rivera-Hidalgo, F. (2003) Smoking and periodontal disease. *Periodontol* 2000 32, 50-58.
- Saito, S., Ngan, P., Saito, M., Lanese, R., Shanfeld, J. & Davidovitch, Z. (1990) Interactive effects between cytokines on PGE production by human periodontal ligament fibroblasts in vitro. *J Dent Res* 69, 1456-1462.
- Saiz Martínez-Acitores, I., Rubio Colavida, J., Espiga López, I., Alonso de la Iglesia, B., Blanco Agular, J., Cortés Mancha, M., Cabrera Ortega, J., Pont Martínez, P., Saavedra Rodríguez, J. & Toledo Pallarés, J. (2003) Plan Nacional de

- Prevención y Control del Tabaquismo. *Revista española de Salud Pública* 77, 441-473.
- Salvi, G.E., Yalda, B., Collins, J.G., Jones, B.H., Smith, F.W., Arnold, R.R. & Offenbacher, S. (1997) Inflammatory mediator response as a potential risk marker for periodontal diseases in insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J Periodontol* 68, 127-135.
- Samant, A., Malik, C.P., Chabra, S.K. & Devi, P.K. (1976) Gingivitis and periodontal disease in pregnancy. *J Periodontol* 47, 415-418.
- Saynes Marín, F. (2006) Manifestaciones otorrinolaringológicas durante el embarazo y su tratamiento. *An Orl Mex* 51, 164-169.
- Scapoli, C., Mamolini, E. & Trombelli, L. (2007) Role of IL-6, TNF-A and LT-A variants in the modulation of the clinical expression of plaque-induced gingivitis. *J Clin Periodontol* 34, 1031-1038.
- Schierano, G., Pejrone, G., Brusco, P., Trombetta, A., Martinasso, G., Preti, G. & Canuto, R.A. (2008) TNF-alpha TGF-beta2 and IL-1beta levels in gingival and peri-implant crevicular fluid before and after de novo plaque accumulation. *J Clin Periodontol* 35, 532-538.
- Schwiers, J. (1964) Les oestrogènes au cours de la second moitié de la grossesse. Bruxelles Arscia SA.
- Seymour, R.M. & Henderson, B. (2001) Pro-inflammatory--anti-inflammatory cytokine dynamics mediated by cytokine-receptor dynamics in monocytes. *IMA J Math Appl Med Biol* 18, 159-192.
- Silness, J. & Loe, H. (1964) Periodontal Disease in Pregnancy. Ii. Correlation between Oral Hygiene and Periodontal Condition. *Acta Odontol Scand* 22, 121-135.
- Skudutyte-Rysstad, R., Eriksen, H.M. & Hansen, B.F. (2007) Trends in periodontal health among 35-year-olds in Oslo, 1973-2003. *J Clin Periodontol* 34, 867-872.
- Socransky, S.S., Haffajee, A.D., Cugini, M.A., Smith, C. & Kent, R.L., Jr. (1998) Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 25, 134-144.
- Sooriyamoorthy, M. & Gower, D.B. (1989) Hormonal influences on gingival tissue: relationship to periodontal disease. *J Clin Periodontol* 16, 201-208.
- Soory, M. (2000a) Hormonal factors in periodontal disease. *Dent Update* 27, 380-383.
- Soory, M. (2000b) Targets for steroid hormone mediated actions of periodontal pathogens, cytokines and therapeutic agents: some implications on tissue turnover in the periodontium. *Curr Drug Targets* 1, 309-325.

- Stewart, J.E., Christenson, P.D., Maeder, L.A. & Palmer, M.A. (1993) Reliability of filter-strip sampling of gingival crevicular fluid for volume determination using the Periotron. *J Periodontal Res* 28, 227-230.
- Stoller, N.H., Karras, D.C. & Johnson, L.R. (1990) Reliability of crevicular fluid measurements taken in the presence of supragingival plaque. *J Periodontol* 61, 670-673.
- Streckfus, C.F. & Bigler, L.R. (2002) Saliva as a diagnostic fluid. *Oral Dis* 8, 69-76.
- Taani, D.Q., Habashneh, R., Hammad, M.M. & Batieha, A. (2003) The periodontal status of pregnant women and its relationship with socio-demographic and clinical variables. *J Oral Rehabil* 30, 440-445.
- Taichman, L.S. & Eklund, S.A. (2005) Oral contraceptives and periodontal diseases: rethinking the association based upon analysis of National Health and Nutrition Examination Survey data. *J Periodontol* 76, 1374-1385.
- Tallon, D.F., Gosling, J.P., Buckley, P.M., Dooley, M.M., Cleere, W.F., O'Dwyer, E.M. & Fottrell, P.F. (1984) Direct solid-phase enzyme immunoassay of progesterone in saliva. *Clin Chem* 30, 1507-1511.
- Theilade, E., Wright, W.H., Jensen, S.B. & Loe, H. (1966) Experimental gingivitis in man. II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. *J Periodontal Res* 1, 1-13.
- Thomson, M.E. & Pack, A.R. (1982) Effects of extended systemic and topical folate supplementation on gingivitis of pregnancy. *J Clin Periodontol* 9, 275-280.
- Tilakaratne, A. & Soory, M. (1999a) Androgen metabolism in response to oestradiol-17beta and progesterone in human gingival fibroblasts (HGF) in culture. *J Clin Periodontol* 26, 723-731.
- Tilakaratne, A. & Soory, M. (1999b) Modulation of androgen metabolism by estradiol-17beta and progesterone, alone and in combination, in human gingival fibroblasts in culture. *J Periodontol* 70, 1017-1025.
- Tilakaratne, A., Soory, M., Ranasinghe, A.W., Corea, S.M., Ekanayake, S.L. & de Silva, M. (2000a) Effects of hormonal contraceptives on the periodontium, in a population of rural Sri-Lankan women. *J Clin Periodontol* 27, 753-757.
- Tilakaratne, A., Soory, M., Ranasinghe, A.W., Corea, S.M., Ekanayake, S.L. & de Silva, M. (2000b) Periodontal disease status during pregnancy and 3 months post-partum, in a rural population of Sri-Lankan women. *J Clin Periodontol* 27, 787-792.

- Trombelli, L., Scapoli, C., Calura, G. & Tatakis, D.N. (2006) Time as a factor in the identification of subjects with different susceptibility to plaque-induced gingivitis. *J Clin Periodontol* 33, 324-328.
- Trombelli, L., Scapoli, C., Tatakis, D.N. & Grassi, L. (2005) Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis: effects of personality traits, social support and stress. *J Clin Periodontol* 32, 1143-1150.
- Trombelli, L., Tatakis, D.N., Scapoli, C., Bottega, S., Orlandini, E. & Tosi, M. (2004) Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis. II. Identification of "high-responder" and "low-responder" subjects. *J Clin Periodontol* 31, 239-252.
- Tsai, C.C., Hong, Y.C., Chen, C.C. & Wu, Y.M. (1998) Measurement of prostaglandin E2 and leukotriene B4 in the gingival crevicular fluid. *J Dent* 26, 97-103.
- Uematsu, S., Mogi, M. & Deguchi, T. (1996) Increase of transforming growth factor-beta 1 in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *Arch Oral Biol* 41, 1091-1095.
- Usandizaga, J.A. & De la Fuente, P. (2005) *Tratado de Obstetricia y Ginecología*. Ed. McGraw-Hill Interamericana.
- van der Velden, U., Winkel, E.G. & Abbas, F. (1985) Bleeding/plaque ratio. A possible prognostic indicator for periodontal breakdown. *J Clin Periodontol* 12, 861-866.
- van Oosten, M.A., Mombelli, A., Gusberti, F.A. & Lang, N.P. (1988) Black-pigmented *Bacteroides* and spirochetes in the subgingival microbiota of prepubertal schoolchildren. *J Periodontal Res* 23, 199-203.
- Velázquez, L. (2006) Fármacos aceptados para el tratamiento de la rinitis alérgica en la embarazada. *Archivos de alergia e inmunología clínica* 37, 74-79.
- Vittek, J., Gordon, G.G., Rappaport, S.C., Munnangi, P.R. & Southren, A.L. (1982a) Specific progesterone receptors in rabbit gingiva. *J Periodontal Res* 17, 657-661.
- Vittek, J., Hernandez, M.R., Wenk, E.J., Rappaport, S.C. & Southren, A.L. (1982b) Specific estrogen receptors in human gingiva. *J Clin Endocrinol Metab* 54, 608-612.
- Vittek, J., Rappaport, S.C., Gordon, G.G., Munnangi, P.R. & Southren, A.L. (1979) Concentration of circulating hormones and metabolism of androgens by human gingiva. *J Periodontol* 50, 254-264.

- Wagaiyu, E.G. & Ashley, F.P. (1991) Mouthbreathing, lip seal and upper lip coverage and their relationship with gingival inflammation in 11-14 year-old schoolchildren. *J Clin Periodontol* 18, 698-702.
- Walker, R.F., Read, G.F. & Riad-Fahmy, D. (1979) Radioimmunoassay of progesterone in saliva: application to the assessment of ovarian function. *Clin Chem* 25, 2030-2033.
- Wang, D.Y., Fantl, V.E., Habibollahi, F., Clark, G.M., Fentiman, I.S., Hayward, J.L. & Bulbrook, R.D. (1986) Salivary oestradiol and progesterone levels in premenopausal women with breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 22, 427-433.
- Weiger, R., Brex, M. & Netuschil, L. (1989) [Comparison of flow rate of sulcus fluid after 30 seconds and 3 minutes test times]. *Oralprophylaxe* 11, 109-113.
- Wiedemann, W., Lahrsow, J. & Naujoks, R. (1979) [The effect of periodontal resistance on experimental gingivitis]. *Dtsch Zahnarztl Z* 34, 6-9.
- Willershausen, B., Lemmen, C. & Hamm, G. (1991) [Modulation of glycosaminoglycan- and collagen synthesis of human gingival fibroblasts by progesterone]. *Dtsch Zahnarztl Z* 46, 668-671.
- Willershausen, B., Lemmen, C., Hamm, G. & Sonnabend, E. (1986) [Human fibroblast cultures under the effect of the hormones estradiol and progesterone]. *Dtsch Zahnarztl Z* 41, 976-978.
- Williams, R.C., Jeffcoat, M.K., Howell, T.H., Rolla, A., Stubbs, D., Teoh, K.W., Reddy, M.S. & Goldhaber, P. (1989) Altering the progression of human alveolar bone loss with the non-steroidal anti-inflammatory drug flurbiprofen. *J Periodontol* 60, 485-490.
- Yalcin, F., Basegmez, C., Isik, G., Berber, L., Eskinazi, E., Soydinc, M., Issever, H. & Onan, U. (2002a) The effects of periodontal therapy on intracrevicular prostaglandin E2 concentrations and clinical parameters in pregnancy. *J Periodontol* 73, 173-177.
- Yalcin, F., Eskinazi, E., Soydinc, M., Basegmez, C., Issever, H., Isik, G., Berber, L., Has, R., Sabuncu, H. & Onan, U. (2002b) The effect of sociocultural status on periodontal conditions in pregnancy. *J Periodontol* 73, 178-182.
- Yanover, L. & Ellen, R.P. (1986) A clinical and microbiologic examination of gingival disease in parapubescent females. *J Periodontol* 57, 562-567.

- Yokoyama, M., Hinode, D., Masuda, K., Yoshioka, M. & Grenier, D. (2005) Effect of female sex hormones on *Campylobacter rectus* and human gingival fibroblasts. *Oral Microbiol Immunol* 20, 239-243.
- Yuan, K., Wing, L.Y. & Lin, M.T. (2002) Pathogenetic roles of angiogenic factors in pyogenic granulomas in pregnancy are modulated by female sex hormones. *J Periodontol* 73, 701-708.
- Yucel, O.O., Berker, E., Gariboglu, S. & Otlu, H. (2008) Interleukin-11, interleukin-1beta, interleukin-12 and the pathogenesis of inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 35, 365-370.
- Zachariassen, R.D. (1993) The effect of elevated ovarian hormones on periodontal health: oral contraceptives and pregnancy. *Women Health* 20, 21-30.
- Zaki, K., el Hak, R., Amer, W., Saleh, F., El Faras, A., Ragab, L. & Nour, H. (1984) Salivary female sex hormone levels and gingivitis in pregnancy. *Biomed Biochim Acta* 43, 749-754.
- Zhong, Y., Slade, G.D., Beck, J.D. & Offenbacher, S. (2007) Gingival crevicular fluid interleukin-1beta, prostaglandin E2 and periodontal status in a community population. *J Clin Periodontol* 34, 285-293.
- Ziskin, D.E., Blackberg, S.N. & Stout, A.P. (1933) The gingiva during pregnancy: an experimental study and a histopathological interpretation. *Surgery, Gynecology and Obstetrics* 57, 719-762.

Capítulo VIII.

ANEXOS



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA.**



FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

- Doña:
- D.N.I.:
- Domicilio:
- Teléfono de contacto:

DECLARO:

- Que Elena Figueru Ruiz ha solicitado mi colaboración para participar en un proyecto de salud bucodental en mujeres embarazadas, que tendrá lugar en el Ambulatorio José Marvá (Área V del IMSALUD) y en la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid.
- Conozco la justificación y los objetivos del proyecto, que son la mejora del conocimiento de las enfermedades gingivales en las pacientes embarazadas, comparando los parámetros clínicos e inmunológicos dentro de un estado hormonal alterado como es el período de gestación.
- Se me ha explicado que se va a controlar y mantener mi salud gingival durante todo el embarazo, así como 3 meses después del parto.
- Para estudiar la inflamación gingival asociada al embarazo, consiento que me tomen muestras de saliva y de fluido crevicular gingival mediante una tira de papel absorbente estéril, tratándose de una técnica no invasiva, completamente indolora y con ningún riesgo ni efectos secundarios asociados.
- Me comprometo a acudir a la Facultad de Odontología o al ambulatorio José Marvá un total de 4 veces, durante los meses 2, 6 y 8 del embarazo y a los 3 meses tras del parto.
- En caso de tuviera alguna patología bucal, se me ofrecerá la posibilidad de ser tratada en la Facultad de Odontología por los profesionales pertinentes.
- He comprendido con claridad las explicaciones facilitadas por las facultativas, y he podido plantear todas las dudas y observaciones que he considerado necesarias.



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA.



- En cualquier momento y sin necesidad de dar ninguna explicación, puedo revocar el consentimiento que ahora presto.
- Por todo lo anterior expuesto, manifiesto que estoy satisfecha con la información recibida y doy mi consentimiento para participar en el proyecto de atención de la salud bucodental en la paciente embarazada.

En Madrid, a de 2.00

Fdo. EL PACIENTE

Fdo. EL ODONTÓLOGO.



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE ODONTOLÓGIA.**



CUESTIONARIO DE SALUD

Fecha:

Embarazada:

Sí ☐

No ☐

A. DATOS DE FILIACIÓN

NOMBRE Y APELLIDOS:.....

EDAD:.....TELÉFONO:.....

DIRECCIÓN:.....

NACIONALIDAD:

1. PROFESIÓN:

a. Funcionario.

b. Empleado.

c. Ejecutivo.

d. Profesión liberal.

e. Ama de casa.

2. ESTUDIOS:

a. Ninguno.

b. Primaria (colegio).

c. Secundaria (Instituto/ FP).

d. Universidad.

3. EMBARAZOS PREVIOS:

a. No.

b. Sí:

- ¿Cuántos?.....

- Alteraciones bucales sufridas:.....

B. HISTORIA DENTAL:

1. Última visita al dentista:.....

2. En su opinión ¿cuál es su estado bucal? a. Malo b. Regular c. Bueno

3. Frecuencia de cepillado dental:

a. 3 o + veces al día.

b. 2 veces al día.

c. 1 vez al día.

d. De manera esporádica.

e. Nunca.

4. ¿Cuándo le hicieron la última limpieza (tartrectomía)?



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA.**



- a. Hace menos de 6 meses
- b. Hace más de seis meses

5. ¿Ha sido diagnosticado anteriormente de enfermedad periodontal o piorrea?

- a. No
- b. Sí ¿Ha recibido tratamiento para ella?

C. HISTORIA MÉDICA:

1. ¿Goza de buena salud? a. Sí b. No

2. ¿Toma o ha tomado recientemente algún medicamento?

- a. No
- b. Sí ¿Cuál?.....

3. Fuma: a. Sí b. No

4. ¿Ha padecido o padece alguna de estas enfermedades?

- | | |
|--|------------------------------------|
| • Afectación del corazón. | • Defectos de neutrófilos |
| • Tensión arterial alta. | • Enfermedad de Crohn. |
| • Diabetes (azúcar en la sangre) | • Manchas en pulmón o tuberculosis |
| • Alteraciones del tiroides | • Ataques o epilepsia |
| • Hepatitis u otra alteración del hígado | • Insuficiencia renal |
| • Leucemia | • Otras..... |

FIRMA DEL PACIENTE

FIRMA DEL ODONTÓLOGO

ANEXO III: ABREVIATURAS

- AVO: All valid observation: mujeres que acuden a al menos una de las visitas del estudio.
- ELISA: *Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay*.
- ES: estadísticamente significativa.
- FCG: fluido crevicular gingival
- IAS: in all surverys: mujeres que acuden a todas las visitas.
- IAS-E: mujeres que acuden a todas las visitas realizadas a lo largo del embarazo (1º, 2º, y 3º visita).
- IG: índice gingival.
- IL-1 β : interleuquina 1 β .
- IP: Índice de placa.
- LPS: lipopolisacárido.
- PGE2: prostaglandina E2.
- PS: Profundidad de sondaje.
- RAR: raspado y alisado radicular.
- Rpm: revoluciones por minuto.
- 13: canino superior derecho.
- 23: canino superior izquierdo.



**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA III**



**KING'S COLLEGE LONDON DENTAL INSTITUTE
DEPARTAMENTO DE PERIODONCIA. REINO UNIDO**

**OXIDANT / ANTIOXIDANT INTERACTIONS
OF NICOTINE, COENZYME Q10,
PYCNOGENOL AND PHYTOESTROGENS IN
ORAL PERIOSTEAL FIBROBLASTS AND
MG63 OSTEOBLASTS.**

ELENA FIGUERO RUIZ

**DIRECTORS
ANTONIO BASCONES MARTÍNEZ
ROCÍO CERERO LAPIEDRA**

**SUPERVISED BY
MENA SOORY**

MADRID, 2009

I. INTRODUCTION.....	261
1. Oxidative stress as an important feature of inflammatory diseases.....	261
2. Environmental oxidative agent: nicotine.....	268
3. Estrogens.....	271
3.1. General.....	271
3.2. Antioxidant effect of estrogens.....	272
4. Role of antioxidants in addition to conventional measures.....	275
4.1. Coenzyme Q10.....	276
4.2. French maritime pine bark: Pycnogenol®.....	278
4.3. Phytoestrogens.....	281
5. Steroid hormones as biomarkers of wound healing.....	285
6. Periosteal fibroblasts and osteoblasts.....	288
 II. HYPOTHESIS AND OBJECTIVES.....	 291
 III. MATERIAL AND METHODS.....	 295
1. Material.....	295
2. Methods.....	299
2.1. Establishing the primary cell culture.....	299
2.2. Passages of cells.....	300
2.3. Freezing cells for preservation.....	301
2.4. Recovery and reconstitution of frozen cells.....	301
2.5. Preparation of multiwell plates.....	301
2.6. Determination of optimal concentrations.....	302
2.6.1. Preparation of the radiolabelled steroids to add to the multiwells.....	302
2.6.2. Incubation of serial concentrations of coenzyme Q10.....	303
2.6.3. Incubations of serial concentrations of Pycnogenol®.....	304
2.6.4. Incubations of serial concentrations of phytoestrogens.....	305
2.7. Setting up experiments.....	306
2.7.1. Incubations of effective concentrations of coenzyme Q10, Pycnogenol® and nicotine, alone and in combination.....	306

2.7.2. Incubations of effective concentrations of phytoestrogens and nicotine, alone and in combination.....	308
2.8. Separation of the metabolites.....	309
2.9. Detections and quantification of radioactive steroid metabolites.....	310
2.10. Statistical analysis.....	316
IV. RESULTS.....	317
1. Determination of optimal concentrations.....	319
1.1. Effect of serial concentrations of coenzyme Q10 on the metabolism of 14C- testosterone by periosteal fibroblasts.....	319
1.2. Effect of serial concentrations of Pycnogenol® on the metabolism of 14C- testosterone by periosteal fibroblasts.....	320
1.3. Effect of serial concentrations of phytoestrogens on the metabolism of 14C- testosterone by periosteal fibroblasts.....	321
2. Setting up experiments.....	322
2.1. Effect of coenzyme Q10, Pycnogenol® and nicotine, alone and in combination, on the metabolism of 14C-testosterone in periosteal fibroblasts.....	322
2.2. Effect of coenzyme Q10, Pycnogenol® and nicotine, alone and in combination, on the metabolism of 14C-testosterone in MG63 osteoblasts.....	325
2.3. Effect of phytoestrogens and nicotine, alone and in combination, on the androgen metabolism using 14C-testosterone as substrate in periosteal fibroblasts.....	330
2.4. Effect of phytoestrogens and nicotine, alone and in combination on the androgen metabolism using 14C-testosterone as substrate in MG63 osteoblasts.....	333
V. DISCUSSION.....	339
1. Nicotine as an axidative agent.....	341
2. CoQ, Pycnogenol ® and phytoestrogens as antixiodative agents.....	344
3. DHT, 4A and Diols.....	349
4. Comparison of both types of cells.....	350
5. Clinical aplication in periodontal therapy.....	351

VI. CONCLUSIONS.....	353
VII. REFERENCES.....	357
VIII. APPENDIX.....	375

Chapter I.

INTRODUCTION

1. Oxidative stress.
2. Nicotine.
3. Estrogens.
4. Role of antioxidants.
5. Steroid hormones as biomarkers.
6. Periosteal fibroblasts and osteoblasts.

1. OXIDATIVE STRESS AS AN IMPORTANT FEATURE OF INFLAMMATORY DISEASES.

Oxidative stress may be defined as a state in which reactive oxygen species (ROS) overwhelm endogenous antioxidant systems (Taniyama & Griendling, 2003). It can result either from an overproduction of ROS or from the inactivation of antioxidants (Wiernsperger 2003). The generation of ROS could cause damaging sequelae to a great number of intracellular macromolecules in eukaryotic cells via several mechanisms, including DNA damage, lipid peroxidation, protein deregulation, overburden of conventional intracellular antioxidants and triggering the inflammatory cytokine cascade (Battino et al. 2003, Moor et al. 2004, Soory 2004).

Antioxidants are defined as any compound that can donate at least one hydrogen atom to a free radical, resulting in the termination of radical chain reactions (Vincent et al 2004). There are two main types of antioxidants in the human body (Agarwal et al. 2005):

a) Enzymatic antioxidants, also known as natural antioxidants.

They are responsible for the neutralization of excessive ROS in order to avoid damaging the cellular structure. This group is formed by superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase.

b) Non-enzymatic antioxidants.

They are also known as synthetic antioxidants or dietary supplements, and they influence the function of the body's antioxidant system. It is composed of vitamins C and E, selenium, zinc, taurine, hypotaurine, glutathione and betacarotene, among others.

During inflammation, one of the first lines of defence are migrating polymorphonuclear cells (PMN) which locate, identify, phagocytize, kill and digest microorganisms and eliminate wound debris. These cells, via the phagocytic isoform of NADPH oxidase, can produce large amounts of O_2^- (superoxide anion radical) which is well known to be critical for defence against bacteria and other pathogens. Bacterial products such as bacterial lipopolysaccharide can induce the activation of phagocytic NADPH oxidase, by lipoproteins or by cytokines such as interferon- γ , interleukine- 1β

(IL-1 β) and IL-8. Superoxide is rapidly converted to a membrane permeable form, H₂O₂ (hydrogen peroxide), by superoxide dismutase activity or even spontaneously. Release of H₂O₂ may promote formation of other oxidants that are more stable including hypochlorous acid, chloramines and aldehydes. The production of oxidants at the wound sites is not restricted to neutrophils alone but may be also produced by macrophages, which appear to initiate a long term response to injured cells subsequent to the acute response. This massive production of ROS in an inflammatory environment is called the “**oxidative burst**”; and this suggests that wound sites are rich in oxidants along with their derivatives (Dröge 2002, Sen et al. 2002).

The concentration of oxidants in question is critically important. Although at micromolar concentrations oxidants such as hydrogen peroxide may favourably influence signal transduction processes that support healing; at millimolar concentrations hydrogen peroxide is likely to overwhelm the antioxidant defence system of the healing tissue, thereby delaying healing (Sen et al. 2002). In an inflammatory environment hydrogen peroxide is produced by activated macrophages at an estimated rate of 2-6 x 10⁻¹⁴ mol/(h x cell), and may reach a concentration of 10 -100 μ M in the vicinity of these cells (Dröge 2002).

There is a growing awareness that oxidative stress may play a role in various **clinical conditions**, such as diabetes mellitus, rheumatoid arthritis, atherosclerosis, malignant diseases and periodontal disease. These diseases can be divided into two major categories: in the first one, we find diabetes and cancer, which show a pro-oxidative shift in the systemic thiol / disulfide redox state and an impaired glucose clearance, suggesting that skeletal muscle mitochondria may be the major site of elevated ROS production (Green et al. 2004). This may be referred to as “mitochondrial oxidative stress”. In the second group, inflammatory oxidative conditions may be found. In these cases, there is an excessive stimulation of NADPH oxidase activity by cytokines and other agents. Increased ROS levels are often associated with pathological changes indicative of a deregulation of signal cascades and / or gene expression (Dröge 2002).

An uncontrolled inflammatory host response with damaging consequences characterizes diabetes mellitus, rheumatoid arthritis and periodontal diseases. Beyond

the initial trigger that initiates these diseases, there are similarities in their pathogenic mechanisms, such as: genetic predisposition, an overwhelming inflammatory response, oxidative stress and its damaging sequelae on connective tissue, cartilage and bone (Soory 2004).

Diabetes Mellitus (DM) is a complex disease characterized by chronic hyperglycaemia. It can be classified into two main types: Type 1 DM, where an impaired insulin production leads to an increase in glycaemia, and type 2 DM, which results from an excessive hepatic glucose production, decreased insulin secretion and insulin resistance. Excessive glucose levels reaching the mitochondria lead to an overdrive on the electron transport chain, resulting in an overproduction of superoxide anions normally scavenged by mitochondrial superoxide dismutase. When the latter fails, oxidative stress develops and this has been proposed as a mechanism responsible for the activation of all major pathways of vascular diabetic complications. There is also a mechanism of auto-oxidation of glucose in the presence of transition metals, as well as the generation of ROS during the process of glycation (Wiernsperger 2003).

Therefore, the abnormally high levels of free radicals induced by hyperglycaemia in addition to a decrease antioxidant capacity are the initial changes that lead to activation of other pathways resulting in cellular dysfunction and damage (Dröge 2002, Taniyama & Griendling 2003, Robertson 2004, Scott & King 2004, Soory 2004, Wiernsperger 2003).

A few small-scale trials have suggested the efficacy of the natural antioxidants vitamin C and E, Coenzyme Q10 and α -lipoic acid in the treatment of diabetes (Green et al. 2004, Scott & King 2004, Singh et al. 2005, Vincent et al. 2004). *In vitro* studies and animal models support the hypothesis that antioxidants improve insulin sensitivity (Ceriello y Motz 2004). These natural antioxidants have the advantage of their safety and that large oral doses are well tolerated. The problem is that antioxidants are distributed through out the body, with only a small proportion reaching the mitochondria, where much of the oxidative damage associated with hyperglycaemia takes place (Green et al. 2004). That would mean that antioxidant therapy is limited to scavenging already formed oxidants and may, therefore, be considered a more

“symptomatic” rather than a causal treatment for oxidative stress (Ceriello y Motz 2004).

Periodontitis is a chronic inflammatory condition featured by loss of connective tissue, alveolar bone resorption and formation of periodontal pockets as a result of the complex interaction between microbial plaque biofilm on root surfaces and the host immune response (Battino et al. 2005). Although this interaction is compulsory for the onset of the disease, uncontrolled inflammatory cycles are known to persist even after removal of the antigenic stimulus. This results in high level of proinflammatory cytokines and free radicals (Soory 2004).

An increased production of intracellular and extracellular superoxide by PMNs during phagocytosis of the periodontal pathogens *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* was demonstrated. Tissue injury due to free radical production has been suggested to be enhanced in individuals with periodontitis due to a lack of adequate antioxidant defence. Exaggerated neutrophil activity may be attributable to defects in the inflammatory response in some individuals, but low antioxidant capacity may also be caused by a number of factors including smoking and poor nutritional status (Sculley & Langley-Evans 2003).

Sculley & Langley-Evans (2003) demonstrated that individuals with the worst periodontal health status tended to have a greater oxidative injury. This could be explained because there is enhanced ROS-mediated damage to tissue in the most advanced states of periodontal disease. Meanwhile, they also found that those individuals with the lowest levels of total antioxidant activity were nearly 4.5 times more likely to have periodontal disease.

It is unlikely that oxidative processes play a causal role in the aetiology of periodontitis, but they are likely to contribute to disease progression, unless abated through antioxidant action. Oxidative stress can be induced by the primary causal agent bacterial plaque, via the host response. Therefore, it appears that reduced antioxidant capacity is part of the pathogenic process of periodontal disease progression. It is certain that lower antioxidant concentrations in the gingival crevicular fluid will contribute to increased damage to the gingivae and surrounded tissues by activated neutrophils (Sculley & Langley-Evans 2003).

In this context, antioxidants may have a potential role in the treatment of inflammatory diseases. Several studies have shown an improved health status in patients with systemic diseases after receiving adjunctive therapy with systemic antioxidants. However, although there is a similarity between these diseases and periodontitis, there is inadequate documentation regarding this topic in the periodontal literature. Only some old articles can be found (Litarru et al. 1967, Nakamura et al. 1973, Tsunemitsu & Matsumara 1967), and there are no *in vitro* studies about them. Therefore, it is important to highlight that more research is needed within this field.

2. ENVIRONMENTAL OXIDATIVE AGENT: NICOTINE

Environmental factors such as smoking have a detrimental effect on healing. Smokers are almost three times as likely to have severe periodontitis compared to non smokers. In general, in studies where plaque accumulation was similar in smokers and non-smokers or was adjusted, current smokers had deeper probing depths, greater attachment loss, more bone loss and fewer teeth (Johnson & Hill 2004, Bergstrom 2004, Rivera-Hidalgo 2003).

The studies have shown a **strong dose-response relationship** between the amount of tobacco smoked and the severity of periodontal destruction; which further supports the role of smoking as a risk factor for periodontitis (Johnson & Hill 2004).

The most marked difference between smokers and non-smokers in probing depths or attachment loss occurs in maxillary lingual area and mandibular anterior teeth, suggesting a local effect of smoking (Bergstrom 2004).

Cells of the oral cavity represent primary exposure to nicotine. Gingival fibroblasts are fundamental components of the periodontal tissue and their role is critical for maintenance of the oral connective tissue and for optimal wound healing responses. Nicotine readily penetrates the epithelial barriers of oral mucosa, where it is able to affect immunological defence mechanisms, to alter some fibroblast functions *in vitro*, such as collagen production and secretion and the growth and attachment of cells to substrates. Thus, this agent can be considered a risk factor in the aetiology and progression of inflammatory periodontal diseases (Argentin & Cicchetti 2004).

Various **factors** contribute to the deleterious effects of smoking on the periodontium, including alterations in both microbial and host response factors. There are conflicting reports on the effects of smoking on the **microflora** which, in part, are explained by differences in methodology and statistical expression of the data. Some studies report no difference in the prevalence of subgingival bacteria associated with periodontitis (Bostrom et al. 2001, Preber et al. 1992, Stoltenberg et al. 1993), while there are others that report a higher prevalence of certain microorganisms in smokers (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia*) (Umeda et al. 1998, Van Winkelhoff et al. 2001, Zambon et al. 1996).

It is widely accepted that smoking affects various aspects of the **innate and immune host responses**. There have been described alterations in numerous functions of oral or peripheral neutrophils, in peripheral blood mononuclear cells, in the levels of various cytokines and in the proliferative capacity of T and B-lymphocytes (Johnson & Hill 2004).

Nicotine, the major component of cigarette smoke has been shown to have damaging effects via an **oxidative pathway** (Argentin & Cicchetti 2004, Crowley-Weber et al. 2003, Van der Vaart et al. 2004, Yildiz et al. 1998). The redox potential is an important factor for wound healing. Animal and in vitro studies report a decrease in the reduced glutathione (GSH) / oxidised glutathione (GSSG) ratio (Chang et al. 2002, Chang et al. 2003, Cigremis et al. 2004). That is an indicator of the vital balance between oxidants and antioxidants (Van der Vaart et al. 2004). An alteration of this ratio has been shown to be associated with an increase in c-fos gene expression, a growth- and differentiation-related immediate early gene (Chang et al. 2003, Walker et al. 2001).

It was reported that oxidants **increase the permeability** of cultured human tracheal epithelial cells, probably through H₂O₂ production and impairment of cell growth and repair. Cigarette smoke which contains oxidants also causes a penetration of electron-opaque horse-radish peroxidase reaction products into the intercellular space of the guinea pig trachea. An alteration of the permeability of epithelial barriers is one of the consequences of acute inflammation (Yamaya et al. 1995).

Nicotine has also **vasoconstrictive properties**, that can impair gingival blood flow and revascularization during soft and hard tissue wound healing which is critical for periodontal procedures.

Nicotine binds to root surface in smokers and it can alter gingival fibroblast attachment (James et al. 1999, Tanur et al. 2000) and β 1-integrin expression (Snyder et al. 2002) and decrease collagen production while increasing collagenase production. It also regulates the production of cytokines (IL-6 and IL-8) (Wendell & Stein 2001) and cyclooxygenase-2 (Chang et al. 2003) in cultured gingival fibroblasts. These findings might help explain the diminished treatment response to surgical periodontal

procedures, especially those involving tissue regeneration (Johnson & Hill 2004, Rivera-Hidalgo 2003, Snyder et al. 2002). *In vitro* studies regarding the effect of acute cigarette smoking show an inhibition of fibroblast function involved in reparatory processes.

It has been suggested that nicotine has **dichotomous effects** (Giannopoulou et al. 2001, Gullihorn et al. 2005, Soory & Suchak 2003, Walker et al. 2001). While smaller effects of nicotine, to which light smokers are exposed, can enhance fibroblast attachment and growth, higher levels of nicotine can be damaging (Peacock et al. 1993). Soory & Suchak (2003) reported that low concentrations of nicotine (1-5 µg/ml) enhanced the expression of 5 α -reductase activity, resulting in the formation of 5 α -dihydrotestosterone (DHT), the physiologically active androgen implicated in stimulating matrix-forming cells. In contrast, higher nicotine concentrations (30, 50, 100 µg/ml) showed an inhibition of 5 α -reductase activity, indicating decreased anabolic activity in fibroblasts. This may be due to interaction between ligand dependent and independent pathways, for stimulation of androgen metabolising enzymes and the release of inhibitory substances at higher concentrations of nicotine, which interfere with androgen metabolism (Soory & Suchak 2003). The increased incidence of periodontal disease and decreased healing responses in heavy smokers may partly be explained by the findings of this investigation.

3. ESTROGENS

3.1. General

Estrogens generally show anabolic effects in tissues, while progesterone is known to have catabolic effects (Bord et al. 2001). It has been suggested that progesterone may function as an immunosuppressant in the gingival tissues of pregnant women, preventing the rapid acute type inflammatory response against plaque, which would result in a chronic tissue reaction with a clinically exaggerated appearance of inflammation (Tilakaratne & Soory 2000).

Estrogen is also the most important factor involved in the balance of bone formation by osteoblasts and osteoclastic bone resorption (Bord et al. 2003, Suh et al. 2003, Chen et al. 2002). It is capable of inhibiting bone resorption via a direct inhibitory effect on osteoclasts (Chen et al. 2002), or via an indirect effect suppressing the cytokine release in osteoblasts (Suh et al. 2003) and increasing the delivery of locally produced growth factors such as transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and platelet derived growth factor-A (PDGF-A), both involved in bone formation (Bord et al. 2001). Traditional steroid estrogen replacement therapy reduces the bone loss and the incidence of fractures in postmenopausal women; however it may be associated with an increased risk of breast cancer.

Estrogens exert their actions by binding to nuclear hormone receptors called **estrogen receptors (ERs)**. They are members of a family of activated transcription factors that can initiate or enhance the transcription of genes. There have been described two subtypes of ERs, ER- α and ER- β , that are distinct proteins, encoded by separated genes and located on different chromosomes (Bord et al. 2003). ER- α is the classical sex-related receptor, responsible in major part for differential growth to produce sexual dimorphism in the developing skeleton. It has been suggested that it can regulate osteoclast differentiation under some circumstances. ER- β is widely distributed in epithelial and mesenchymal tissues. It has been proved to be the major responsible for changes in osteoblast proliferation matrix synthesis in MG63 cell line (Cao et al. 2003).

ERs found in osteoblast-like cells provide a mechanism for a direct action on bone (Bord et al. 2003, Chen et al. 2002). It has even been demonstrated that *in vitro* primary

human osteoblasts from young donors respond to estrogen (17 β -estradiol: 10⁻¹⁷- 10⁻¹⁰M) by increasing the expression of ER- α and ER- β protein expression. After 48h-incubation, the levels of ER- β returned to basal levels, whereas ER- α expression continued to rise. This could indicate that cells had not reached the mineralizing stage and collagen synthesis was not down-regulated, suggesting a potential mechanism for the observed anabolic effect produced by high-dose estrogen, with the ER- α / ER- β ratio dependent on the age of the person, the dose and the length of time of estrogen treatment (Bord et al. 2003).

ERs are also located in periosteal fibroblasts, scattered fibroblasts of the lamina propia and periodontal ligament fibroblast, proving the different actions of fibroblasts in different periodontal tissues. Some of these actions refer to the absence of gingival inflammation with increased amount of plaque under an estrogenic effect (Reinhardt et al. 1999). It has been demonstrated an inhibitory effect on proinflammatory cytokines released by human marrow cells (Gordon et al. 2001) and in PMN chemotaxis (Ito et al. 1995); a reduction in T-cell mediated-inflammation (Josefsson et al. 1992) and a suppression in leukocyte production from the bone marrow (Josefsson et al. 1992).

3.2. Antioxidant effects of estrogens

Life expectancy in women is higher than that of males (Fernández-Ballesteros et al. 1999). The basis of this difference is still unknown, but it has been attributed to a difference in estrogen concentrations (Asdell et al. 1967, Borrás et al. 2003). It has been demonstrated that the oxidative damage to mitochondrial DNA is 4-fold higher in males than in females' rats (Borrás et al. 2003). This may be due to the higher expression of antioxidant enzymes in mitochondria from females when compared with males. Therefore, it is necessary to analyze the potential role of estrogens in oxidative stress.

Antioxidant actions have been attributed to estrogens, such as 17 β -estradiol, estrone or estriol (Chiang et al. 2004; Dantas et al. 2002, Moor et al. 2004; Strehlow et al. 2003; Itagaki et al. 2005). However the exact mechanism responsible for this process is not completely understood. Some authors have proposed that they are able to act as hydroxyl scavengers by virtue of the hydrogen-donating capacity of their phenolic groups (Dubey et al. 1999; Haliwell et al. 1987). This would imply a *direct non*

receptor-dependent mechanism. But, these observations have been reported at low micromolar concentrations, while the physiological plasma concentration of estrogen is in the nanomolar range. That means that a direct scavenger effect might not be the major mechanism involved (Moor et al. 2004)

Evidence regarding that hormone action is independent of binding to classic receptors has been studied by Wang et al. (2003) in cultured human lens epithelial cells. They reported that the addition of an estrogen receptor antagonist to the cultured cells previously challenged with hydrogen peroxide (50 and 100 μ M) and 17 β -estradiol (1nM - 10 μ M), did not block the protection provided by 17 β -estradiol against hydrogen peroxide insult. They suggested that the cytoprotective effects of 17 β -estradiol in that cell line were not dependent on its ability to affect the production of soluble ROS, but to its capacity to protect against collapse of mitochondrial membrane potential, ATP depletion and cell death (Moor et al. 2004, Wang et al. 2003).

Other authors have proposed that estrogen modulates the generation of free radicals by **interacting with its nuclear receptor** and therefore, decreasing oxidative proteins and / or increasing antioxidative enzymes expression (Arnal et al. 1996, Itagaki et al. 2005, Kim et al. 1996, Moor et al. 2004, Strehlow et al. 2003).

Strehlow et al. (2003) tested the antioxidant effects of 17 β -estradiol at a concentration of 1 μ mol/l in cultured vascular smooth cells from rat thoracic aorta. They obtained that after 12 hour-incubation, 17 β -estradiol prevented angiotensine II-induced ROS production. They propose that estrogen may exert their antioxidant actions via a direct impact on antioxidant defence mechanisms, as they also reported an up-regulation in superoxide dismutase activity after incubation with 17 β -estradiol. They proposed that these actions were mediated by ER activation, as it was proved by their blockage after co-stimulation with the ER antagonist.

A modulatory effect of estrogens in **NADPH oxidase activity** has also been suggested (Dantas et al. 2002, Itagaki et al. 2005). It has been demonstrated in an *in vitro* study with cultured rat hepatic stellate cells that physiological concentrations (10⁻⁹-10⁻⁷ mol/L) of estradiol were capable of inhibiting ROS generation, lipid peroxidation and antioxidant enzyme loss via the suppression of NADH / NADPH oxidase activity through the estrogen receptor. Even more, it was shown that the stimulatory effects of

progesterone (10^{-7} - 10^{-6} mol/L) in ROS generation were inhibited by simultaneous incubation with estradiol in a dose-dependent manner. This indicates that there is a competing regulation between the actions of estradiol and progesterone on oxidative stress-induced ROS generation originating from NADH / NADPH oxidase (Itagaki et al. 2005).

The effects of estrogen in NADPH oxidase activity were proved by Dantas et al. (2002) in microvessel from spontaneous hypertensive female rats (*in vivo*). They evaluated the effects of physiological concentrations of estrogen (203.2pg/ml) on oxidative stress, and they observed an influence of estrogen in oxidative stress via modulation of NADPH oxidase activity

It has been reported that estrogen supplementation could be beneficial against heart disease through the ***inhibition of lipoprotein peroxidation***. Jain et al. (2004) demonstrated in an *in vitro* study with U937 monocyte cell culture model that premenopausal physiological concentrations of estrogen (1, 10nM) significantly decreased oxidative stress caused by high-glucose (30mM) treatment.

The potential beneficial effects of estrogens have been widely reported in the literature; however, they have ***adverse side effects***, such an increase in the risk of breast cancer (Suh et al. 2003). The use of agents with estrogenic activity (phytoestrogens), but without their negative side-effects would be a great advance in the treatment of several diseases, and among them periodontal disease.

Therefore, an *in vitro* study was designed to test the potential role of three antioxidants, alone and in combination with nicotine, in the metabolism of testosterone by cultured human periosteal fibroblasts and osteoblasts.

4. ROLE OF ADJUNCTIVE ANTIOXIDANTS IN CONJUNCTION WITH CONVENTIONAL MEASURES

Conventional measures for management of patients affected by periodontal disease include oral hygiene instructions, scaling and root planing, and different approaches to periodontal surgical procedures. The outcome of these therapies is subjected to the healing ability of the damaged tissues.

As it has been reviewed, one important problem in achieving good results after periodontal treatment is found in smokers. Tissues exposed to high levels of nicotine have a reduced healing potential (Johnson & Hill 2004). This has lead researchers to look for alternatives ways for treating this problem.

In recent years, an increasing interest in antioxidant agents is growing in General Medicine. They are being used for treating several diseases in which increased oxidative damage is the common feature. Among them, periodontal diseases may be included. However, conventional Dentistry has not resorted to using these agents in quite the same way as in General Medicine for their application in periodontal patients. Only a few authors have reported the benefits of employing antioxidants agents as adjuncts in conventional periodontal treatment.

This study will review the role of three well-known antioxidant agents - Coenzyme Q10, Pycnogenol® and phytoestrogens – and it will test the effects of these agents in human cultured osteoblasts and periosteal fibroblasts, in order to improve the current existing methods for treating periodontal patients.

4.1. Coenzyme Q₁₀

Coenzyme Q₁₀ (CoQ), or urbedicarenone, is intrinsic to human tissue including the gingiva, and is a vitamin according to the basic science of nutrition. It has a fundamental role in the electron transfer reaction of respiration and coupled oxidative phosphorylation in mitochondria (Nakamura et al. 1974, Watts 1995) (Figure 1).

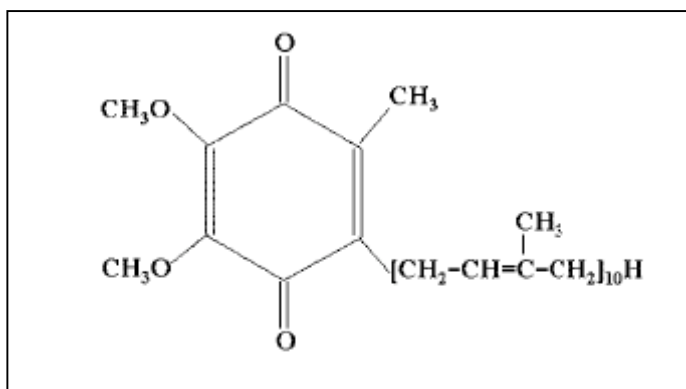


Figure 1: Chemical structure of CoQ.

The biosynthesis of CoQ in the human body is a nutritional process, since it is derived from dietary tyrosine by a largely known sequence of biosynthetic reactions (Littarru et al. 1971). It is also found in a wide range of foods (Watts 1995).

The existence of CoQ in the gingival tissue of human is apparent from the demonstration of the specific activities of the CoQ-enzyme system of mitochondrial origin (Littarru et al. 1971).

In 1967, Tsunemitsu and Matsumura first described the clinical administration of a form of coenzyme Q (CoQ₇) to patients with severe destructive periodontal disease and hypercitricemia. They reported that the hypercitricemia was normalized by the oral administration of CoQ₇ (Tsunemitsu & Matsumura 1967).

However, the role of CoQ in periodontal disease has not been known until Littarru et al. (1971) found that gingival biopsies from patients with diseased periodontal tissue showed a deficiency of CoQ, in contrast to patients with normal periodontal tissue, which showed no deficiency. That report provided an account of the first treatment with CoQ of a patient with periodontal disease in the United States.

Nakamura et al. (1973) studied the enzyme activities of the succinate dehydrogenase-CoQ reductase in the absence and in the presence of exogenous CoQ. A study of this CoQ-enzyme in gingival mitochondria from patients with obvious periodontal disease indicated a deficiency of CoQ at its succinate site.

Matsumara et al. (1973) conducted a double-blind trial of CoQ in patients with destructive periodontitis who had not benefited adequately from the hygienic phase. Clinical examination and statistical analysis revealed therapeutic improvement from the administration of CoQ. It was concluded that in certain patients oral hygienic phase combined with therapy with CoQ could provide improved treatment and longer benefits.

Presumably, the diseased gingival tissue could require more energy to generate new tissue and it is achieved through the bioenergetics of respiration, which requires CoQ (Nakamura et al. 1974). CoQ has reported beneficial effects in mopping up free radicals, improving periodontal treatment outcome measures (Hanioka et al. 1994, Lunn et al. 1997, Nylander et al. 1996,) and lowering glucose levels in diabetic patients respectively (Liu et al. 2004). It has antioxidant effects on fibroblasts and osteoblasts.

CoQ has been used for treatment of various systemic diseases. In the case of Parkinson's disease a potential role of the mitochondria in the pathogenic process has been suggested on the basis of a mitochondrial respiratory chain complex I deficiency and oxidative damage in postmortem brain tissues of Parkinson's disease patients. Winkler-Stuck et al. (2004) reported a restoration of the activity of the respiratory chain complexes after skin fibroblasts from Parkinson's disease patients were incubated in a medium with 5 μ M CoQ. They propose that the main action of CoQ under their experimental conditions is due to its antioxidants property, protecting mitochondrial DNA from oxidative damage.

4.2. French maritime pine bark, Pycnogenol®

The term *pycnogenol* was firstly introduced to describe an entire class of flavonoids composed of flavan-3-ol derivatives. The word is formed by the Ancient Greek *puknos* (condensed) and *genos* (class, family).

The first reference of the use of Pycnogenol in health sciences comes from the 4th century BC when Hipocrates mentions its use against inflammatory diseases. Later, in the *Thesaurus Medicaminum*, compiled by the pharmacist H Minner in 1947, pine bark was considered helpful for wound healing. In the New World, Native Americans utilized the bark of pine as a food, beverage and a remedy for various conditions (Packer et al. 1999). In 1535 Jacques Cartier and his men were caught in the middle of winter in Quebec (Canada). Because of the absence of fruits and vegetables, they developed scurvy, with severe implications in their periodontal tissues. Local Indians prepared a tea derived from the bark of some specific native pine trees. A few days after drinking this beverage, Cartier and his crew experienced a recovery from their gingival disease (Kimbrough et al. 2004). Since then, this pine bark extract has been used in Europe and North America for the treatment of inflammatory diseases and wound healing (Grimm et al. 2003).

Currently, Pycnogenol® is a proprietary phytochemical extracted from the bark of the French maritime pine (*Pinus maritima*) from Bag of Biscay in the Landes de Gascogne in France. It is a blend of monomeric phenolic compounds (catechin, epicatechin and taxifolin) and condensed flavonoids (procyanidins). These condensed polyphenols are formed by “bricks” of the flavan -3-ols catechin and epicatechin linked together into lengths ranging from dimmers to heptamers (B1, B3 and B7). In addition, it contains phenolic acids, such as p-hydroxy benzoic, protocatechuic, gallic, vanillic, p-coumaric, caffeic and ferulic acids (Kimbrough et al. 2004, Ni et al. 2002); and glycosylation products (glucopyranosyl derivatives of either flavonols or phenolic acid) as minute constituents. It is now employed as a nutritional supplement and a phytochemical remedy for various diseases (Packer et al. 1999).

Flavonoids exert direct antioxidant activities, via direct scavenging of free radicals. They have a highly reactive hydroxyl group that gets oxidized by electron-donation (Schmitt-Schillig et al. 2005).

Pycnogenol® exerts a strong antioxidant action. Phenolic acids, polyphenols and flavonoids are composed of one or more aromatic rings bearing one or more hydroxyl groups. Therefore, they are potentially able to quench free radicals by forming resonance-stabilized phenoxyl radicals (Packer et al. 1999). This activity has been demonstrated by *in vitro*, *in vivo* and animal studies (Packer et al. 1999, Siler-Marsiglio et al. 2004). Blazso et al. (1994) observed a correlation between the antioxidant activity of Pycnogenol® and the anti-inflammatory response. It can affect cell death and survival after various types of proapoptotic stimuli (Pereira & Oliveira 1997).

Pycnogenol® protects against H₂O₂-induced DNA damage (O'Brien et al. 2000). Concentrations ranging from 20 to 80 µg/ml are associated with a significant protection from lipid peroxidation and cell damage induced by t-butyl hydroperoxide (Rong et al. 1994). And even minimal concentrations such as 2.5 µg/ml have been shown to protect pigmented epithelium of the retina from lipid peroxidation induced *in vitro* by ferric iron (Ueda et al. 1996).

In cell culture systems with endothelial cells or keratinocytes the maritime pine bark extract inhibited the activation of NF-KB and expression of the adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1. Furthermore, it was demonstrated that the release of ROS was inhibited by pre-treatment of cells with pine bark extract before challenge with tumour necrosis factor α (TNF- α) (Grimm et al. 2004).

In vivo studies have demonstrated that Pycnogenol® is bioavailable in humans. However, these studies have to be interpreted with caution because the compounds in the supplementation mixture may not be the compounds that eventually exert biologic activity (Packer et al. 1999). It has also been shown to be therapeutically effective at a daily dosage of 75 mg against melasma, (characterized by an increase in oxidative stress) with no associated side effects (Ni et al. 2002).

Recently, there have been some attempts at applying the antioxidant activities of Pycnogenol® in the field of wound healing. During the healing process, collagen matrix remodelling occurs. It requires abundant amounts of ascorbic acid for the post-translational hydroxylation of proline. Furthermore, the balance of the matrix-specific proteinases and their inhibitors is involved in the degradation of the injured matrix and the synthesis of another matrix in exchange. It has been shown that Pycnogenol® and its constituents display a high affinity to matrix proteins, such as collagen and elastane (Blazso et al. 2004). Blazso et al. (2004) demonstrated in an animal study with rats that regular topical application of Pycnogenol® (1-5%) during a 20-day period accelerates the wound healing process in skin and reduces scar formation. They also have a strong inhibitory effect towards the activity of metalloproteinase-1 (MMP-1), MMP-2 and MMP-9. This may in part explain the effect of Pycnogenol® in protecting them from proteolytic degradation via MMPs (Grimm et al. 2004).

In the world of Periodontology there has been not much research about the use of Pycnogenol® for the treatment of inflammatory periodontal disease. Kimbrough et al, (2002) demonstrated a reduction in the mean bleeding scores of 50% in a group of healthy patients chewing six pieces of Pycnogenol® (5mg) daily for 14 days. They suggested that the use of Pycnogenol® chewing gums could minimize gingival bleeding and dental plaque formation via their anti-inflammatory activity.

Battino et al. (2005) added 100 µl of a Pycnogenol®-enriched toothpaste extract to the culture medium of human keratinocytes cell cultures 48 hours prior to challenging the cells with hydroxide peroxide (150µM). After an incubation period of 30 minutes they measured the cell viability / cytotoxicity. The results showed that there was an absence of any influence (neither toxicity nor protection) of the toothpaste extract on immediate cell viability. Therefore, although the role of Pycnogenol® in scavenging ROS is well-known, perhaps these results could be attributed to the formulation of the toothpaste itself, with the antioxidant extract being retained in the paste because of its lower hydrophilicity.

In summary, as it has been shown there is increasing interest in the potential role of Pycnogenol® in the treatment of inflammatory diseases in general medicine; however, there are only a few studies about its effects on periodontal tissues.

4.3. Phytoestrogens

Phytoestrogens are plant derived, non-steroidal compounds which have a unique diphenolic structure that gives them a high stability (Dang & Lowik 2005, Magee & Rowland 2004). Based on their chemical structures they can be classified into three main groups: flavonoids, coumestans and lignans. The group of flavonoids includes flavanones, flavones and isoflavones (Dang & Lowik 2005, Dijsselbloem et al. 2004, Whitehead & Lacey 2003) (Figures 2 and 3).

In recent years, phytoestrogens have attracted much attention because of their potential beneficial role in prevention and treatment of several systemic diseases (cardiovascular diseases, osteoporosis, DM, obesity, etc) (Dang & Lowik 2005, Magee & Rowland 2004, Oh et al. 2005).

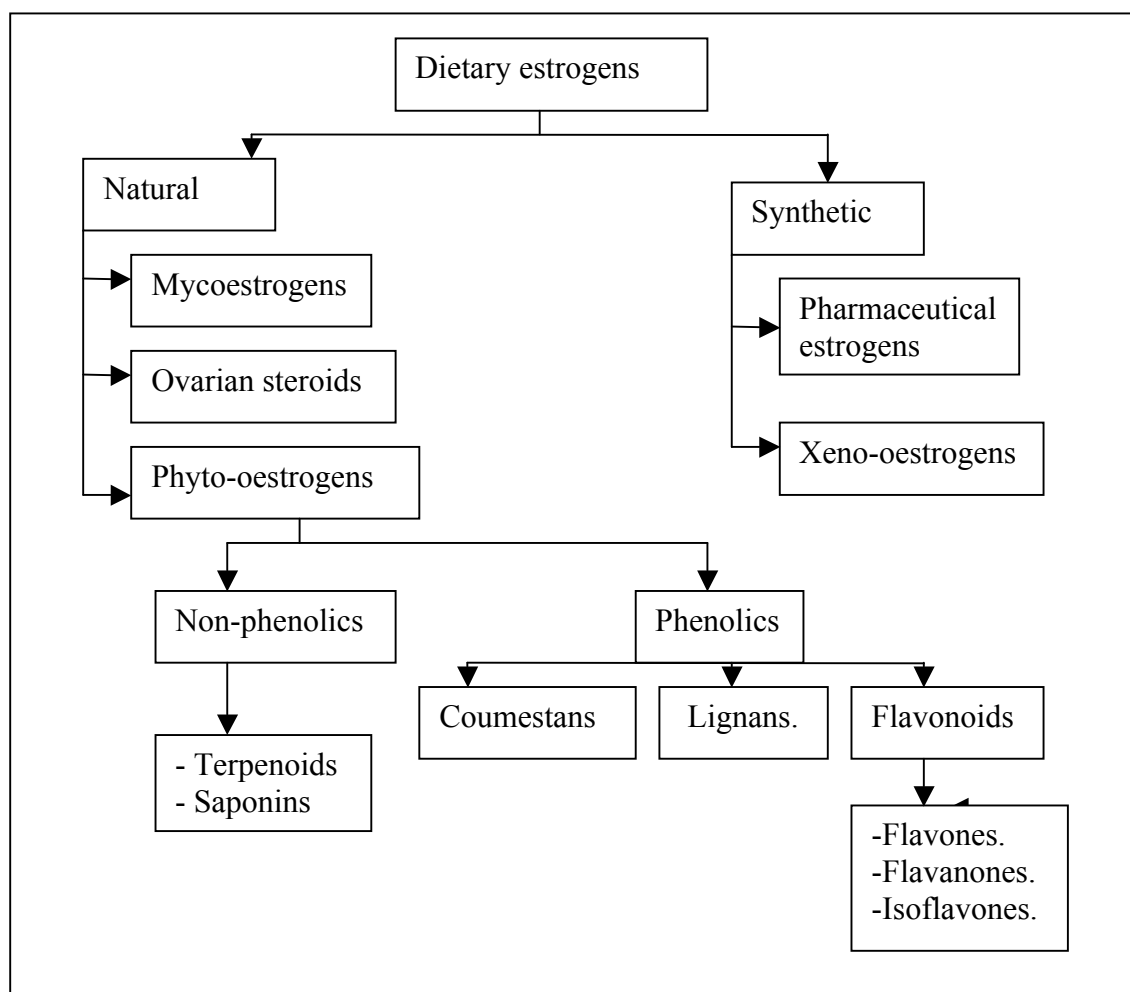


Figure 2: Classification of dietary estrogens.

Phytoestrogens share structural features with estrogens: they have particular hydroxyl groups that can be positioned in a stereochemical configuration virtually identical to the one of estrogen. Due to this structural similarity, they have the ability to combine with **ERs**. They can bind to both ER- α and ER- β with different affinities (Dijsselbloem et al. 2004, Magee & Rowland 2004, Morito et al. 2002). Their affinity for ER- α is 100 times lower than that of estrogens, while they seem to preferentially bind to the ER- β isoform (Dijsselbloem et al. 2004, Magee & Rowland 2004). The most active compound is coumestrol that binds to both ER- α and ER- β with strength similar to that of 17 β -estradiol (Morito et al. 2002). They can therefore act as estrogen agonists and antagonists competing for estradiol at the receptor complex, and they have been proposed as potential alternative therapies for osteoporosis (Suh et al. 2003).

ER expression is induced by oxidative stress, which affects to ER- α and ER- β expression differently. This suggests that estrogen may have a role in self-protective mechanisms of cells. This may help explain the effects of estrogens and phytoestrogens in diseases involving inflammation (Tamir et al. 2002). It is important to highlight that although the relative binding affinity of estrogen for each receptor isotype is stated to be at least 1000-fold higher than that of phytoestrogens; the latter could evoke biological responses, because of the higher achievable concentrations in plasma as compared to the endogenous hormone estradiol (Dijsselbloem et al. 2004).

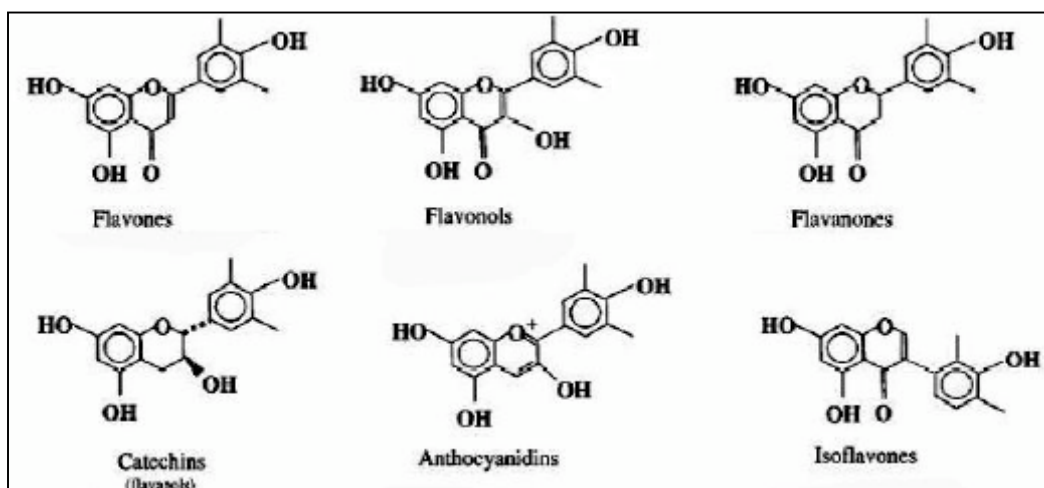


Figure 3: Main types of phytoestrogens.

Isoflavonoids are mainly found in “Leguminosae”. Among them, genistein (4',5,7-trihydroxyisoflavone), daidzein (4,7-dihydroxyisoflavone) and their 4'-methylether derivatives, biochanin A and formononetin, respectively, are the best known. In recent years, genistein has attracted considerable attention because epidemiological studies have demonstrated an association between soy-bean containing diets and a decrease in the incidence in certain human cancers in Asian populations (Barnes et al. 1990).

Phytoestrogens are usually ingested in their conjugated forms. They undergo extensive hydrolysis by enzymes (β -glucosidases) released in the intestinal tract by bacteria. These enzymes can either hydrolyse the sugar moiety or demethylate these compounds, releasing the principal aglycones, genistein and daidzein. These aglycones can be directly absorbed by non-ionic passive diffusion through the gut wall and enter enterohepatic circulation, or can first undergo further biotransformation to a range of metabolites. Genistein is metabolized mainly into 6'-hydroxy-O-demethylangolensin and 8-hydroxydaidzein. Daidzein is transformed into o'-demethylangolensin and equol (Rimbach et al. 2003).

Subsequently, only less than 3% of the free aglycone can be detected in blood. Moreover, the grade of further metabolization of isoflavones by gut bacteria is subjected to large inter-individual variation, depending on gastrointestinal microflora and diet (Dijsselbloem et al. 2004, Rimbach et al. 2003). Therefore, these metabolites, rather than their parent compounds, are the ones to which cells are predominantly exposed (Rimbach et al. 2003).

Phytoestrogens can exert their potential beneficial effects via both their estrogenic properties (binding to estrogen receptors) (Dijsselbloem et al. 2004, Magee & Rowland 2004) and via an antioxidative pathway (Rimbach et al. 2003). Genistein and daidzein have been proved to scavenge hydroxyl and superoxide anion radicals. However, the metabolism of the aglycone forms (genistein and daidzein) enhances their antioxidant properties, being more potent in scavenging hydroxyl and superoxide anion radicals than the aglycones themselves (Rimbach et al. 2003).

In vitro studies indicate that phytoestrogens inhibit proliferation of several tumours, induce differentiation, and reduce angiogenesis (Dijsselbloem et al. 2004). However, Pool-Zobel et al. (2000) could not demonstrate a beneficial effect of genistein (12.5-100 μ M) in inhibiting DNA damage; even more, they found that genistein was an inducer of DNA strand breaks in human colon cells.

An anabolic role of phytoestrogens in bone has been proposed (Jia et al. 2003). Coumestrol, daidzein and genistein (10^{-7} - 10^{-6} M) are capable of increasing alkaline phosphatase activity and enhancing bone mineralization in cultures of MC3T3-E1 cells, an osteoblasts-like cell line, suggesting an implication in bone metabolism (Kanno et al. 2004). Yamaguchi & Gao (1998) demonstrated an inhibitory effect of genistein (10^{-7} - 10^{-5} M) on bone resorption induced by parathyroid hormone and prostaglandine-E in female rat osteoblasts (increase in bone alkaline phosphatase activity and decrease in bone acid phosphatase activity). Jia et al. (2003) demonstrated a stimulatory effect of daidzein (10, 100 μ M) in different levels of osteoblasts differentiation, from the early stage (increase in alkaline phosphatase activity) to the last one (increase in osteocalcine) in osteoblasts cell culture from calvarian of newborn Wistar rats, proposing a mechanism mediated via bone morphogenetic protein-2 activity, as they found it to be increased after incubation of cells with daidzein. It has been reported that soybean isoflavones inhibit TNF- α -stimulated apoptosis and production of IL-6 and prostaglandin E₂ by osteoblastic cells in vitro (Suh et al. 2003). All these studies suggest a potential role of phytoestrogens in the treatment and prevention of bone loss.

A dose-dependent effect of phytoestrogens on bone has also been described. Low concentrations enhance osteogenesis and inhibit adiposis, while high concentrations have the opposite effects, with isoflavones influencing bone formation rather than bone resorption. These biphasic effects may be due to the concurrent activation of ERs and peroxisome proliferators-activated receptors, which produce divergent actions in the same cell-tissue (Dang & Lowik 2005).

5. STEROID HORMONES AS BIOMARKERS OF WOUND HEALING

Hormones are specific regulatory molecules that modulate reproduction, growth, development and maintenance of the internal environment, as well as energy production, utilization and storage. They can be classified into four main groups based upon their chemical structure: steroids, glycoproteins, polypeptides and amines.

Steroid sex hormones are derived from cholesterol. They shared a common structure formed by three rings of six carbon atoms. All of them play an important role in the maintenance of the skeletal integrity (Mascarenhas et al. 2003).

Sex hormones exert their influence by binding to specific **intracellular receptors** that belong to a superfamily of ligand-activated transcription factors that regulate cell growth, differentiation and development. The receptors are zinc finger proteins sharing a highly conserved DNA-binding domain that interact with hormone-response elements and modulate the transcription of target genes. The formation and activity of sex hormone-receptor complexes thereby play an important part in cell interactions, inflammation and connective tissue breakdown (Parkar et al. 1996).

It has been suggested that sex hormones may have an important role in chronic inflammatory periodontal diseases. The expression of androgen receptor has been detected in a high proportion of periodontal and gingival tissue and in fibroblasts derived from the same source (Parkar et al. 1996, Vittek et al. 1979). It has also been shown that periodontal tissues are capable of metabolizing sex hormones and thereby are able to form their respective potentially active metabolites (Vittek et al. 1979).

Androgens (testosterone) are hormones responsible for masculinization. They affect skeletal maturation and exert significant effects on the homeostasis of mature bone (Issa et al. 2002).

Testosterone is converted by the enzyme steroid 5 α -reductase (5 α -R) to 5 α -dihydrotestosterone (DHT) before binding to the androgen receptor (Vanderschueren et

al. 2004). This explains the importance of taking into account the metabolism of the hormone within the cell type studied (Issa et al. 2002).

DHT has been found to be biologically more potent than testosterone, because it binds more tightly to the androgen receptor, and the DHT-receptor complex activates a receptor reporter gene more efficiently than testosterone. DHT may even regulate specific genes that do not respond to testosterone. In addition, it has been reported that in most androgen target organs, DHT is the most active intracellular androgen when 5 α -R activity is present (Issa et al. 2002).

Thus, 5 α -R plays a central role in androgen action by catalyzing the conversion of testosterone to the more potent hormone DHT. Two 5 α -R isoenzymes, designated type 1 and 2, have been identified. Type 1 isoenzyme is found predominantly in peripheral tissues, while type 2 is found abundantly in male reproductive tissues and is associated with target tissues. It has been suggested that type 1 enzyme has a catabolic role, while the type 2 enzyme has an anabolic one (Issa et al. 2002, Normington & Ruseell 1992; Tilakartne & Soory 2000). The rat type 2 isoenzyme has 10 to 20-fold higher affinity for testosterone than type 1 isoenzyme, and it has been shown to be anabolic in androgen target tissues (Normington & Ruseell 1992) (Figure 4).

The physiologically active androgen DHT is implicated in stimulating matrix-forming cells (Vittek et al. 1979), and there is documented evidence of its anabolic effects (Tilakaratne & Soory 2000). The rate of periosteal bone formation has been shown to be significantly elevated in response to DHT alone and in combination with estrogen (Coxam et al. 1996).

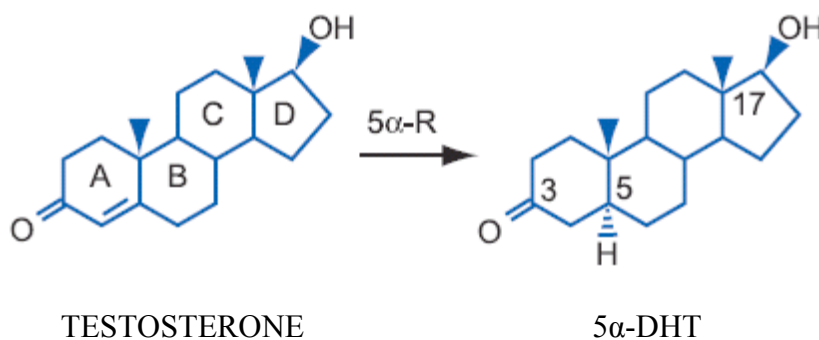


Figure 4: Metabolic conversion of testosterone to dihydrotestosterone mediated by 5 α -reductase activity.

This finding suggests that matrix turnover in gingiva is characteristic of androgen target tissue and that steroid hormone metabolic profiles could serve as indices of healing responses in gingiva (Soory & Suchak 2003). Therefore, testosterone and DHT acting directly on the periodontium may have an important anabolic role in connective tissue and bone repair processes. Thus, in chronic inflammatory periodontal diseases, when anabolic activity in affected tissue is considerably reduced, the effect of testosterone would be of maximum importance.

In view of the anabolic effects of circulating androgens on healing and repair (Coxam et al. 1996) it is relevant to study the modulatory effects of nicotine, phytoestrogens, coenzyme Q10 and Pycnogenol®, alone or in combination, on androgen metabolism in cultured human periosteal fibroblasts and in osteoblasts in the context of oxidative stress.

Effects Of Androgens In The Periodontium

- | |
|---|
| <ol style="list-style-type: none">1. Stimulate matrix synthesis by osteoblasts and periodontal ligament fibroblasts.2. Stimulate osteoblast proliferation and differentiation.3. Reduce IL-6 production during inflammation4. Inhibit prostaglandin secretion.5. Enhance osteoprotegerin concentration. |
|---|

Taken from Mascarenhas et al. 2003.

6. PERIOSTEAL FIBROBLASTS AND OSTEOLASTS

6.1. Osteoblasts

Osteoblasts have their origin in the multipotential stem cell in bone marrow (Bai et al. 2004). They produce alkaline phosphatase activity, type I collagen and osteopontin in association with matrix maturation and mineralization (Kanno et al. 2004).

The effect of oxidative stress in osteoblasts has been studied by different authors. In vitro studies have demonstrated that an excess in ROS was capable of inhibiting differentiation in osteoblasts. Recent reports showed that incubation of MC3T3-E1, a mouse preosteoblast cell line, and M2-10B4, a mouse marrow stromal cell line, with oxidants such as H₂O₂ (1Mm), xanthine (25µm) and xanthine oxidase (25mU/ml), resulted in an increase in ROS. This oxidative stress was capable of inhibiting alkaline phosphatase activity, and therefore, inhibited differentiation in bone cells (Mody et al. 2001). These results have been confirmed by Bai et al. (2004), with even less concentrations of H₂O₂ (0.1mM) inhibiting osteoblastic differentiation (reduction of alkaline phosphatase activity, type I collagen and colony-forming unit osteoprogenitor) in rabbit calvarian osteoblasts and bone marrow stromal cells. All the effects were blocked with the addition of an antioxidant (Trolox) to the medium (Mody et al. 2001). The mechanism responsible for this process is not yet well understood, but it has been proposed that extracellular signal-regulated kinases (ERKs) and NF-κB might play an important role in it, as they were both activated by H₂O₂ (Bai et al. 2004).

Bone is a target tissue for sex steroid action as it has been demonstrated by the presence of estrogen (Bord et al. 2003, De Wilde et al. 2004, Eriksen et al. 1988, Vanderschueren et al. 2004) and androgen receptor (Colvard et al. 1989, Vanderschueren et al. (2004) (ER and AR) in osteoblasts. It determines the ability of this cell-type to respond to these steroids. However, depending on the development stage of the osteoblast cells, the profile expression for each receptor seems to be different. Wiren et al. (2004) studied the levels of ER and AR during in vitro osteoblasts differentiation using normal rat calvarial-derived primary osteoblastic cultures. They reported that ER-α expression was highest during the matrix maturation stage, while declining in post-mineralizing cultures. ER-β expression remained fairly constant

during all the developmental stages, being more elevated than ER- α in post-mineralizing cultures. The highest levels of AR were achieved during the differentiation and mineralization stages, suggesting a potential role for androgens in the regulation of osteoblasts differentiation and mineralization. Therefore, they suggested a biologically relevant role for sex steroid during normal osteoblasts differentiation.

Androgens could be defined as potent inhibitors of bone resorption (Davey et al. 2000, Liegibel et al. 2002, Vanderschueren et al. 1992, Vanderschueren et al. 2004) and inducers of osteoblasts proliferation (Kasperk et al. 1989). It has been shown that both ground fragments of human bone and cultured human osteoblasts-like cells express 5 α -reductase activity, and therefore they can form DHT from circulating androgen precursors (Bruch et al. 1992, Schweikert et al. 1980). The type 1 isoenzyme is the predominantly active enzyme in human osteoblasts-like cells (Issa et al. 2002).

DHT has been proved to induce osteoblast differentiation via an increase in osteoblastic differentiation markers (Davey et al. 2000, Mason & Morris 1997, Vanderschueren et al. 2004). *In vivo* studies with female rats showed an increase in serum alkaline phosphatase (Mason & Morris 1997) and in mRNA levels of α 1(I) collagen, osteocalcin, alkaline phosphatase and osteopontin in bone samples of rats sacrificed after having received a dose of 40 mg/kg body weight of DHT (Davey et al. 2000).

Androgens may also modify the impact of mechanical strain in bone, by directing its metabolism from a high turnover and bone-losing state into an anabolic process (Liegibel et al. 2002). Human bone cells are anchored to the organic bone matrix via adhesion receptors of the integrin superfamily (Liegibel et al. 2002). Integrin receptors physically connect the extracellular bone matrix with cytoskeletal microfilaments. This link enables osteoblasts to respond more rapidly to deformation strain. This has been proved by Liegibel et al. (2002) in an *in vitro* study with cultured human osteoblasts grown in the presence or absence of a testosterone metabolite (DHT). They applied a deformation strain of 17KPa during one hour, after a 3 hour-period rest, for a total of 48 hours. They obtained an increase of alkaline phosphatase activity, type 1 collagen and osteoprotegerine secretion, after pre-treatment with DHT (10nM).

As well as androgens, estrogens exerts antioxidant effect in bone cell cultures, as they are capable of increasing alkaline phosphatase activity, osteocalcin and osteoprotegerin secretion (Bord et al. 2003, De Wilde et al. 2004, Okazaki et al. 2002)

Nicotine can also affect osteoblasts, as it has been demonstrated by Walker et al. (2001) by the presence of a specific receptor for nicotine in human primary osteoblasts, human trabecular bone biopsies from tibial fracture repair patients and the osteoblasts-like MG63 cell line.

6.2. Fibroblasts.

Fibroblasts are spindle-shaped cells with oval nuclei and readily apparent nucleoli (Tanur et al. 2000).

Nicotine binds to root surface in smokers and it can alter gingival fibroblast attachment (James et al. 1999, Tanur et al. 2000) β 1-integrin expression (Snyder et al. 2002) and decrease collagen production while increasing collagenase production. It also regulates the production of cytokines (IL-6 and IL-8) (Wendell & Stein 2001) and cyclooxygenase-2 (COX-2) (Chang et al. 2003) in cultured gingival fibroblasts.

Chapter II.

HYPOTHESIS AND OBJECTIVES

HYPOTHESIS

Oxidants such as nicotine or glucose are responsible for a reduction in the levels of DHT, while antioxidants, such as CoQ, Pycnogenol® and phytoestrogens are capable of increasing the levels of DHT over control incubations. In addition, antioxidants will be able to neutralize the effects of oxidants, by means of increasing DHT yields above incubations with the oxidants alone.

OBJECTIVES

1. Determine the effect of nicotine in the metabolism of ¹⁴C-testosterone by cultured human periosteal fibroblasts and osteoblasts.
2. Analyse the role of antioxidants such as CoQ, Pycnogenol® and phytoestrogens on the activity of 5 α -reductase, in cultured human periosteal fibroblasts and osteoblasts.
3. Identify the role of these antioxidants in suppressing the catabolic role induced by nicotine, by increasing the amounts of DHT over those obtained with nicotine alone.
4. Compare the effects of these agents in two different cell types: human periosteal fibroblasts and osteoblasts.
5. Find an application for the results obtained *in vitro* in future clinical trials in periodontal patients, specifically in smokers.

Chapter III.

**MATERIAL AND
METHODS**

1. MATERIALS

Authentic steroids

Authentic steroids were supplied by Sigma Chemicals Co (Poole, Dorset, UK). They were dissolved and redistilled in ethanol (supplied by Merck Chemicals Ltd; Dagenham, Essex, UK) at appropriate concentrations and stored.

Radioactive steroids

The radioisotope ^{14}C -Testosterone (specific activity $58\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) was obtained from Amersham International (Amersham, Bucks, UK). It was provided in 1 ml toluene solution. The toluene solvent was evaporated and the ^{14}C -Testosterone was reconstituted in 1 ml of ethanol. The radioactive concentrations of these steroids were $50\mu\text{Ci}/\text{ml}$.

Solvents

The organic solvents for thin layer chromatography (benzene and acetone), ethyl acetate for extraction of metabolites and chloroform to solubilise the dried bulk of extracts were all provided by BDH Chemicals (Merck) (Dagenham, Essex, UK).

Testing agents

The antioxidants CoQ10 and Pycnogenol® were gifted by Pharmanord Ltd. The plant extracts phytoestrogen was obtained from Bootes' chemists. Nicotine was provided by Sigma Chemicals Ltd., Fancy Road, Poole Dorset. They were all stored in a freezer at -20°C , after aliquoting in suitable concentrations.

Material for thin layer chromatography

The thin layer chromatography (TLC) plates were pre-coated silicagel kieselgel 60 (20 x 20cm) obtained from BDH Chemicals Ltd (Merck), Dagenham, Essex, UK.

Tissue culture materials

The incubation medium used was Eagle's Minimum Essential Medium (MEM), with 10% foetal bovine serum (FBS), L-glutamine (200mM), penicillin (5000 IU/ml) and streptomycin (5mg/ml) solution and sodium bicarbonate in order to obtain a neutral

pH. The transport medium used for transportation of tissues was Hank's Balanced Salt Solution (BSS). They were all provided by Invitrogen Ltd; Scotland.

The tissue culture flasks, Petri dishes, multi-well plates and sterile ampoule used for storage of cells were also purchased from Gibco Ltd. Trypsin (0,25%) was used to trypsinize the cells.

Culture cells

Human periosteal fibroblasts (HPF) were obtained from eight patients (4 males and females), aged 30 to 50 years, with muco-gingival / periodontal problems attending the Department of Periodontology, King's College Dental Institute, London, UK. They were all free of medication and in good general health. Patient consent and approval from the local Ethics Committee were obtained.

Human osteoblasts were obtained from a permanent cell line isolated from human osteosarcoma, called MG-63, gifted by the Eastman Dental Hospital. The advantage of using a well-characterised cell line ensures homogeneous responses from osteoblasts cell cultures. However, its most important limitation is the loss of osteoblast characteristics after a number of passages (Lieberherr et al. 2003).

2. METHODS

2.1. ESTABLISH THE PRIMARY CELL CULTURE

2.1.1. Obtaining the periosteal tissues

The patients underwent muco-gingival advanced flap procedures or surgical pocket elimination after completion of initial phase periodontal therapy, which consisted of oral hygiene instruction and complete root surface debridement of affected sites. The tissue was obtained from the surface of the bone, at the base of split-thickness mucoperiosteal flaps (Periodontology, King's College Dental Hospital Trust).

It is well documented that fibroblasts derived from inflamed tissue demonstrate a higher metabolic activity with androgen substrates at baseline compared with fibroblasts passage from non-inflamed tissues (Sooriyamoorthy & Gower 1989, Sooriyamoorthy et al. 1990). In the present study samples were not categorized by sexes based on some studies which have shown that although gingival tissues from healthy males metabolized testosterone better than that of healthy females, chronically inflamed mucosa from both genders did not show any difference in testosterone metabolism (Ojanotko et al. 1980, Sooriyamoorthy & Gower 1989).

Individual tissue samples obtained from patients were not pooled, in order to maintain their individuality.

2.1.2. Establishing periosteal fibroblasts in culture (primary cell culture line)

The tissues isolated during periodontal surgical procedures were washed in physiological saline serum, placed in sterile universal containers in Hank's Balanced Salt Solution.

They were serially washed with Eagle's MEM, placed in a 60mm sterile Petri dish with a drop of medium and minced into 1 mm³ small fragments in a shearing action by using two scalpels with number 11 blades. The tissue fragments were carefully transferred into 25cm² angled neck tissue culture flasks with a minimum quantity of Eagle's MEM. They were spread around the base of the flask using a Pasteur pipette. It is important that the amount of medium used is just enough to wet the tissue and allow it to attach to the base of the flask and not to float.

The flasks were incubated overnight with their lids loosely shut, at 37°C in a humidified air containing 5% CO₂ (LEEC automatic CO₂ incubator model GA2, Nottingham, UK) and air: CO₂ (95%: 5%). This procedure assists the process of

attachment of the tissue fragments to the base of the flask, which is necessary for fibroblasts growth.

The medium was changed every 3 to 4 days taking due care not to disturb and dislodge the attached tissue fragments. Fibroblasts usually started growing within 7 to 10 days and reached confluence within 3 to 4 weeks. The cells were viewed under an Olympus inverted microscope to confirm growth.

Loss of cell lines was often a problem in establishing the primary cell culture. Yeast was the most common cause of contamination. Some protection from bacterial contamination was overcome by incorporating penicillin and streptomycin in the culture medium.

When fibroblasts reached confluency from the primary culture, they were subsequently serially sub-cultured.

2.2. PASSAGES OF CELLS

The culture medium was removed from the flask and trypsin (0.25%, v/v, 1-2 ml) was added and swirled around the flask, allowing through wetting of cells. The cells were allowed to stand in it approximately one minute at room temperature until they became rounded and detached. This was verified by viewing under the microscope. The excess solution was then pipetted off, leaving only a film of trypsin over the cells. The flask was placed in a humidified incubator at 37°C.

This procedure is called trypsinisation, and is used for partial digestion and cell separation in order to enable serial passaging of fibroblasts/osteoblasts that reach confluency either from the primary culture or from a subculture.

The extent of trypsinisation was monitored by examining the flask under the microscope from time to time, because cell death could occur if the cells were allowed to remain too long in trypsin.

Immediately after complete separation occurred, 1ml of Eagle's MEM was added to eliminate traces of the enzyme. It was ejected up and down repeatedly among the base of the flask by using a finely drawn Pasteur pipette. This was done in order to break up cell aggregates and to ensure a distribution of cells among the entire medium.

More medium was added up to make 15 ml and the cells were redistributed into three other flasks (5 ml of medium in each one). The expanded population could be frozen down for preservation or employed for the experiments (fibroblasts of the fourth to ninth passage in monolayer culture).

2.3. FREEZING CELLS FOR PRESERVATION

After trypsinisation, 1 ml of Eagle's MEM was added to the flask. Once a cell suspension was obtained, it was transferred into a sterile ampoule containing 100µl of dimethyl sulphoxide (DMSO-10% v/v). The DMSO acted to prevent intracellular crystallization during freezing. The cryogenic tubes were closed and placed into the main compartment of the refrigerator at 4°C for 20 minutes. They were then placed into an insulated box in the freezer at -80°C for two hours. Finally, they were stored in the vapour phase of a liquid nitrogen vat at -180°C to complete the gradual slow cooling process.

2.4. RECOVERY AND RECONSTITUTION OF FROZEN CELLS.

Once the fibroblasts / osteoblasts were needed for setting up the experiments, the ampoules containing the cells were carefully removed from liquid nitrogen vat. They were immediately placed into a 37°C water bath, using a rapid thawing technique for their reconstitution in order to minimize the likelihood of cell damage. Once thawed, the contents of the ampoules were transferred into a universal container and 4ml of Eagle's MEM were added. They were centrifuged for 12 minutes at 1100rpm and a cell pellet was formed. The supernatant containing DMSO was removed and the pellet was reconstituted in 5ml Eagle's MEM and transferred into a 25cm² angled neck tissue culture flask. The medium was changed twice weekly until growth was re-established.

2.5. PREPARATION OF MULTIWELL PLATES.

Once the cells (fibroblasts or osteoblasts) in the 25 cm² flask were fully confluent they could be used for setting up a multi-well plate. Cells should be trypsinised in order to break the aggregates that exist among them, and the same procedure previously described was followed (For reference view: 2.2. Passage of cells).

Culture medium was added to make up a volume of 24ml. It should be ejected up and down repeatedly among the base of the flask by using a finely drawn Pasteur pipette, ensuring a distribution of cells among the entire medium.

The suspension of cells was distributed into a 24-wells multi-well plate, adding 1ml in each well, and the plate was placed into an incubator at 37°C with humidified air

containing 5% CO₂. It was maintained there until the cells reached confluency (48 hours) in order to prevent mitogenic effects. The growth was verified by using an Olympus inverted microscope.

The presence of similar number of cells in each well could be confirmed by carrying out cell counting using a haemocytometer. It was formed by two chambers, each one containing 9 large squares of 1 mm² area. Immediately after trypsinisation, the cells were counted over the centre and four corner squares. The former was divided into 25 squares, which were then in turn divided into another 16 small squares. The coverslip was then passed over the grid to obtain the interference patterns with 0.1mm depth of the chambers. The number of cells per millilitre of cell suspension was $n \times 10^3$, being n the total number of cells counted from both chambers.

14C-Testosterone was incubated within the confluent monolayer cultures, in the presence or absence of each testing agent in order to analyse the androgen metabolism in each case, compared to control values.

2.6. DETERMINATION OF OPTIMAL CONCENTRATIONS

2.6.1. Preparation of the radiolabelled steroids to add to the multiwells

14C-testosterone was preserved in a stock solution containing 50µCi in 1 ml of toluene. The latter was evaporated and the radiolabelled steroid reconstituted in 1ml of ethanol. Therefore, in 1ml of ethanol there will be a radioactivity corresponding to 50µCi.

Each 24well multi-well plate required 12µl of 14C-testosterone, which were dispensed into 24ml of medium. Each well contained 0.5µl of 14C-Testosterone; that means, that there was 0.025µCi of radioactivity per well.

In a universal container, 24ml of medium were added in conjunction with the 12µl of 14C-testosterone necessary for each 24-well plate. This content was then distributed into 6 bijoux containers of 4ml each. Serial concentrations of each testing agent were added to its bijoux and their contents transferred into the 24-multiwell (1ml per well).

2.6.2. Incubation of serial concentrations of coenzyme Q10

In order to study the effects CoQ in cultured HPF using ^{14}C -testosterone as a substrate, it was necessary to find out first the effective concentration of CoQ responsible for the HPF stimulation in an adequate rank. This effective concentration would be used for the subsequent set of experiments.

One 24-well plate was prepared with serial concentrations of CoQ (5, 10, 20, 30 and 50 $\mu\text{g/ml}$). The stock solution was made at a concentration of 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Therefore, in order to obtain the required concentrations of CoQ, the volume of stock solution needed was calculated following the scheme shown in figure 5.

[CoQ]	5 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	20 $\mu\text{g/ml}$	30 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$
Volume from stock solution	2 μl (distributed among 4 wells)	4 μl (distributed among 4 wells)	8 μl (distributed among 4 wells)	12 μl (distributed among 4 wells)	20 μl (distributed among 4 wells)

Figure 5: Table showing the volumes of stock solution needed for each CoQ concentration.

The control incubation consists of ^{14}C -Testosterone in the absence of CoQ.

A schematic representation of the multiwell used is shown in the following figure (Figure 6).

C a	CoQ(5 $\mu\text{g/ml}$)a	CoQ(10 $\mu\text{g/ml}$) a	CoQ(20 $\mu\text{g/ml}$)a	CoQ(30 $\mu\text{g/ml}$)a	CoQ(50 $\mu\text{g/ml}$)a
C b	CoQ(5 $\mu\text{g/ml}$)b	CoQ(10 $\mu\text{g/ml}$) b	CoQ(20 $\mu\text{g/ml}$)b	CoQ(30 $\mu\text{g/ml}$)b	CoQ(50 $\mu\text{g/ml}$)b
C c	CoQ(5 $\mu\text{g/ml}$) c	CoQ(10 $\mu\text{g/ml}$) c	CoQ(20 $\mu\text{g/ml}$)c	CoQ(30 $\mu\text{g/ml}$)c	CoQ(50 $\mu\text{g/ml}$)c
C d	CoQ(5 $\mu\text{g/ml}$) d	CoQ(10 $\mu\text{g/ml}$) d	CoQ(20 $\mu\text{g/ml}$)d	CoQ(30 $\mu\text{g/ml}$)d	CoQ(50 $\mu\text{g/ml}$)d

*C=control

Figure 6: Scheme of the 24-well plate prepared to determine the optimum concentration of CoQ.

2.6.3. Incubation of serial concentrations of Pycnogenol®

In the same manner as it was done for CoQ, a new set of experiments was prepared for determining the optimum concentration of Pycnogenol®. A 24-well plate with culture HPF was incubated for 24 hours with the substrate 14C-Testosterone, in the absence or presence of serial concentrations of Pycnogenol® (50, 100, 150, 200, 300µg/ml).

The stock solution was made at a concentration of 10µg/µl. The volumes of stock solution required to obtain the desirable concentrations of Pycnogenol® are shown in figure 7.

[Pyc]	50µg/ml	100µg/ml	150µg/ml	200µg/ml	300µg/ml
Volume from stock solution	20µl (distributed among 4 wells)	40µl (distributed among 4 wells)	60µl (distributed among 4 wells)	80µl (distributed among 4 wells)	120µl (distributed among 4 wells)

Figure 7: Table showing the volumes of stock solution required for each Pycnogenol® concentration.

The corresponding scheme for the plate is the one shown in figure 8.

C a	Pyc(50µg/ml) a	Pyc(100µg/ml) a	Pyc(150µg/ml) a	Pyc(200µg/ml)a	Pyc(300µg/ml)a
C b	Pyc(50µg/ml) b	Pyc(100µg/ml) b	Pyc(150µg/ml)b	Pyc(200µg/ml)b	Pyc(300µg/ml)b
C c	Pyc(50µg/ml) c	Pyc(100µg/ml) c	Pyc(150µg/ml)c	Pyc(200µg/ml)c	Pyc(300µg/ml)c
C d	Pyc(50µg/ml) d	Pyc(100µg/ml) d	Pyc(150µg/ml)d	Pyc(200µg/ml)d	Pyc(300µg/ml)d

*C=Control, Pyc= Pycnogenol®.

Figure 8: Schematic representation of the 24-well plate prepared to calculate the optimum concentration of Pycnogenol®.

2.6.4. Incubation of serial concentrations of phytoestrogens

In the same manner as it was done previously, a 24-well plate is prepared in order to find the optimum concentration of phytoestrogens to be used later on. Confluent monolayer cultures of HPF were incubated with the substrate ^{14}C -Testosterone for 24 hours in the presence or absence of serial concentrations of phytoestrogens (10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{g/ml}$).

The stock solution was made at a concentration of 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Each concentration of phytoestrogens required a different volume of the stock solution (figure 9)

[Phyt]	10 $\mu\text{g/ml}$	20 $\mu\text{g/ml}$	30 $\mu\text{g/ml}$	40 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$
Volume from stock solution	4 μl (distributed among 4 wells)	8 μl (distributed among 4 wells)	12 μl (distributed among 4 wells)	16 μl (distributed among 4 wells)	20 μl (distributed among 4 wells)

Figure 9: Table showing the volumes of stock solution required for each phytoestrogen concentration.

A schematic representation of the multiwell used is shown in figure 10.

C a	Phyt (10 $\mu\text{g/ml}$) a	Phyt (20 $\mu\text{g/ml}$) a	Phyt (30 $\mu\text{g/ml}$) a	Phyt(40 $\mu\text{g/ml}$) a	Phyt(50 $\mu\text{g/ml}$) a
C b	Phyt (10 $\mu\text{g/ml}$) b	Phyt (20 $\mu\text{g/ml}$) b	Phyt (30 $\mu\text{g/ml}$) b	Phyt(40 $\mu\text{g/ml}$) b	Phyt(50 $\mu\text{g/ml}$) b
C c	Phyt (10 $\mu\text{g/ml}$) c	Phyt (20 $\mu\text{g/ml}$) c	Phyt (30 $\mu\text{g/ml}$) c	Phyt(40 $\mu\text{g/ml}$) c	Phyt(50 $\mu\text{g/ml}$) c
C d	Phyt (10 $\mu\text{g/ml}$) d	Phyt(20 $\mu\text{g/ml}$) d	Phyt (30 $\mu\text{g/ml}$) d	Phyt(40 $\mu\text{g/ml}$) d	Phyt(50 $\mu\text{g/ml}$)d

*C= Control; Phyt = Phytoestrogens

Figure 10: Scheme of the 24-well plate prepared to determine the optimum concentration of phytoestrogens.

2.7. SETTING UP EXPERIMENTS

2.7.1. Incubations of effective concentrations of Coenzyme Q10, Pycnogenol® and nicotine, alone and in combination as determined in preceding experiments

In order to set up this experiment, one universal container and 6 bijoux were needed. In the universal container, 12µl of 14C-Testosterone were added to 24 ml of medium. This content was distributed in the five bijoux (4ml in each one), with the 4ml remaining in the universal container to be used as controls.

The bijoux were labelled with the name of the agent /s they were going to receive: CoQ, Pycnogenol®, Nicotine, CoQ + Nicotine, Pycnogenol + Nicotine.

- Preparation of CoQ.

In order to obtain a final concentration of 20µg/ml, 8µl from the stock solution were needed and poured into the specific bijoux (see figure 5)

- Preparation of Pycnogenol®.

Pycnogenol was required at a concentration of 150µg/ml; therefore, 60µl from the stock solution were poured into the specific bijoux (see figure 7)

- Preparation of Nicotine (250µg/ml):

Optimal concentration of nicotine was established previously (Soory & Tint, 2004)

Nicotine stock solution has a concentration of 100µg/µg. In order to obtain a final concentration of 250µg/ml, 2.5µl of the stock solution were necessary for each well. In the design of the experiment there are 4 wells per testing agent, so, 10µl from the stock solution are poured into the specific bijoux.

- Preparation of the combination of CoQ (20µg/ml) and nicotine (250µg/ml).

8µl from the CoQ stock solution and 10µl from the nicotine stock solution were mixed into 4ml of medium in its correspondent bijoux.

- Preparation of the combination of Pycnogenol® (150µg/ml) and nicotine (250µg/ml).

60µl from the Pycnogenol® stock solution and 10µl from the nicotine stock solution were mixed into 4ml of medium in its correspondent bijoux.

The content of each bijoux was transferred to the correspondent column of the 24-well plate (see figure 11) adding 1ml into each well.

C a	CoQ (20µg/ml) a	Pyc (150µg/ml) a	Nic (250µg/ml) a	CoQ+Nica	Pyc + Nica
C b	CoQ (20µg/ml) b	Pyc (150µg/ml) b	Nic (250µg/ml) b	CoQ+Nicb	Pyc + Nicb
C c	CoQ (20µg/ml) c	Pyc (150µg/ml) c	Nic (250µg/ml) c	CoQ+Nicc	Pyc + Nicc
C d	CoQ (20µg/ml) d	Pyc(150µg/ml) d	Nic (250µg/ml) d	CoQ+Nic d	Pyc + Nic d

Figure 11: Schematic representation of the 24-well plate set up to determine the oxidant /antioxidant effects of CoQ, Pycnogenol® and Nicotine, alone and in combination of CoQ + Nicotine and Pycnogenol + Nicotine.

*Pyc= Pycnogenol®; Nic= Nicotine.

This experiment was set up twice with each type of cell (cultured human periosteal fibroblasts and osteoblasts), in order to obtain an n=8 in each case.

2.7.2. Incubation of effective concentrations of phytoestrogens and nicotine, alone and in combination

In this experiment two concentrations of phytoestrogens (10 and 40µg/ml) and nicotine (250µg/ml), alone and in combination with phytoestrogens (10µg/ml) + nicotine and phytoestrogens (40µg/ml) + nicotine were tested in order to study the potential oxidant / antioxidant role of the agents as they were compared to control incubations.

The procedure employed to set up the experiment was the same as the one described previously. In this case, the phytoestrogens stock solution was made at a concentration of 10µg/µl. In order to obtain a concentration of 10µg/ml in each of the four wells of the column, 4µl from the stock solution were needed. In the case of the concentration of 40µg/ml, 16µl from the stock solution were required (see figure 9).

A schematic representation of the 24-well multiwell prepared is shown in figure 12.

Two 24-well multiwells with human periosteal fibroblasts and two with human osteoblasts from MG63 cell line were prepared.

C a	Phyt(10µg/ml) a	Phyt(40µg/ml) a	Nic (250µg/ml) a	Phyt(10µg/ml) +Nic a	Phyt(40µg/ml) + Nic a
C b	Phyt(10µg/ml) b	Phyt(40µg/ml) b	Nic (250µg/ml) b	Phyt(10µg/ml) +Nic b	Phyt(40µg/ml) + Nic b
C c	Phyt(10µg/ml) c	Phyt(40µg/ml) c	Nic (250µg/ml) c	Phyt(10µg/ml) +Nic c	Phyt(40µg/ml) + Nic c
C d	Phyt(10µg/ml) d	Phyt(40µg/ml) d	Nic (250µg/ml) d	Phyt(10µg/ml) +Nic d	Phyt(40µg/ml) + Nic d

Figure 12: Schematic representation of the 24-well plate set up to determine the oxidant /antioxidant effects of phytoestrogens and nicotine, alone and in combination of phytoestrogens (10µg/ml) + Nicotine and phytoestrogens (40µg/ml)+ Nicotine.

*Isof= isoflavonoid; Nic= Nicotine

2.8. SEPARATION OF METABOLITES

The 24-well multiwell plates were incubated for 24 hours in a humidified cell-culture incubator. The medium from each multiwell was then transferred into their correspondent labelled test tubes (24). 1 ml of ethyl acetate was added into each tube, and carefully mixed using a whirlimix, in order to halt the metabolic process. The formed steroid metabolites were extracted using a clean pipette and placed into another set of labelled test tubes. This step was repeated a second time adding another ml of ethyl acetate to each test tube.

These last sets of test tubes were maintained in a vortex evaporator for 40 minutes (Gyrovap; Philip Harris House, London, UK) with the purpose of reducing the supernatant to a small bulk. 80µl of chloroform were then added to each test tube and whirlimixed. The content from each test tube was spotted with the aid of pipettes on the TLC plates, with each isolated sample representing metabolites from a single incubation (Figure 14).

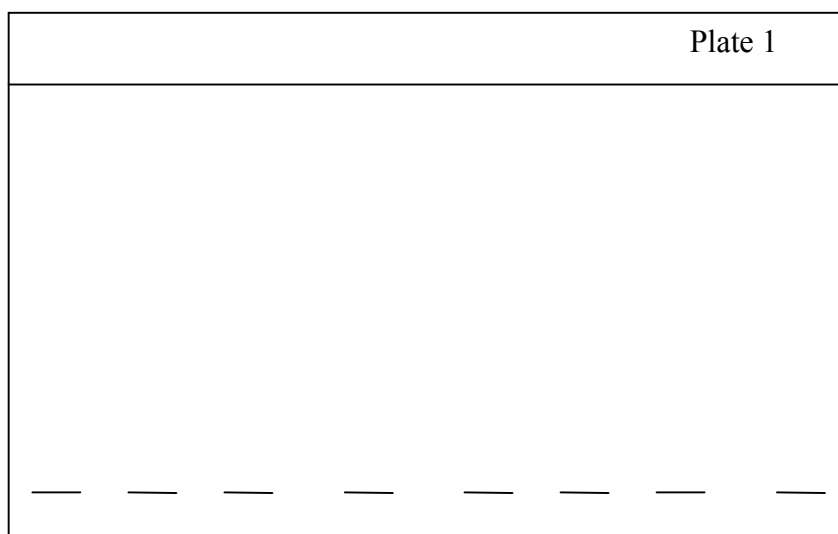


Figure 14: Graphic representation of a thin layer chromatography plate.

TLC plates were run in a benzene / acetone solvent system (4:1 v/v) for their separation.

2.9. DETECTION AND QUANTIFICATION OF RADIOACTIVE STEROID METABOLITES

The separated metabolites on the TLC plates were scanned using a radioisotope scanner linked to a computer for their quantification.

Principles and use of radioisotope scanner (Berthold Linear Analyzer)

The linear analyzer LB 284/285 (using 10% methane and 90% argon) is a system used for the measurement of ionizing radiation, especially of radiolabelled thin layer plates, filter mats, electrophoresis gels and tissue sections. It measures the intensity and distribution of radioactivity with high speed and detection sensitivity. The image of the radiation distribution was also created and displayed on the monitor screen. The linear analyzer is essentially designed for the same application as the TLC scanner, but there is one fundamental difference, that is, the thin layer scanner counts only that part of chromatogram that is positioned directly below the slit diaphragm. The chromatogram or the TLC plate is scanned in many single steps and the number of steps is dependent on the step-width.

The linear analyzer scans an entire chromatogram at once, using a position sensitive proportional counter tube. It measures many tracks of one or several TLC plates consecutively in single steps in the Y-plane and creates one-, two- and three-dimensional images of the intensity and position of the radiation. The advantages of using the linear analyzer is that it gives high detection sensitivity and works at a speed of about 100 times greater than that of the thin layer scanner.

The main property of the analyzer is the detector, a position sensitive and a proportional counter tube. It has a positively charged counting wire, the anode, and several cathode wires of the high-resolution counter tube. The α -particles emitted by a sample enter the wire chamber from the base through an entrance window measuring 200mm or 250mm long and 15mm wide.

A special gas mixture of 90% argon and 10% methane continuously flushed the counter tube in order to make the α -particles entering through the window ionize the argon gas on their trajectory. Electrons released in this process move toward the anode wire with increasing speed, constantly gaining energy, until they in turn ionize gas

atoms. In the direct vicinity of the anode wires, the number of electrons increases in an avalanche-like manner (charge multiplication process); each newly generated electron creates a new one and so forth. Thus a charge zone is created at the anode wire which can be measured. The emitted α -particles entering the detector then create a charge zone at the anode wire above the position of its emissions. The charges of the charge zone are proportional to the ionization of the emitted particle. The position of the charge zone, which is the position of the emitted α -particles, is measured via the propagation time of the signals.

In the X-plane, the position of the α -particles is measured by the die propagation of the pulses and in the Y-plane measured by the position of the detector (the counting wire) which is moved by a stepper-control. The number of pulses per “length element” (=0.25mm; for a 25cm counter tube length, 1024 channels are available) is integrated and transferred to the computer for the intensity measurement. The degrees of intensity are shown on the monitor screen and can be printed out in different shades of peaks and identified as the number of counts.

The TLC plates are measured consecutively in single steps in many tracks depending on the size of the entrance window and the step-width. A print out of the radiation distribution includes all the measured values.

Quantification of radioactive steroids metabolites

The results obtained from the radioisotope scanner were measured in radioactive counts per minute (cpm). These values were then converted into disintegrations per minute (DPM) by taking into account analytical losses and quench corrections.

First of all, it is necessary to note that in 1 μl of ^{14}C -testosterone, there was 0.05 μCi ; therefore, as we put 0.5 μl of ^{14}C -testosterone in each well, they had a reactivity of 0.025 μCi .

Then, we transformed the Ci units into DPM. It is known that 1 μCi has 2.2×10^6 DPM; as a consequence, in 0.025 μCi per well, there was 110,000 DPM ($0.005 \times 2.2 \times 10^6$) (Figure 15).

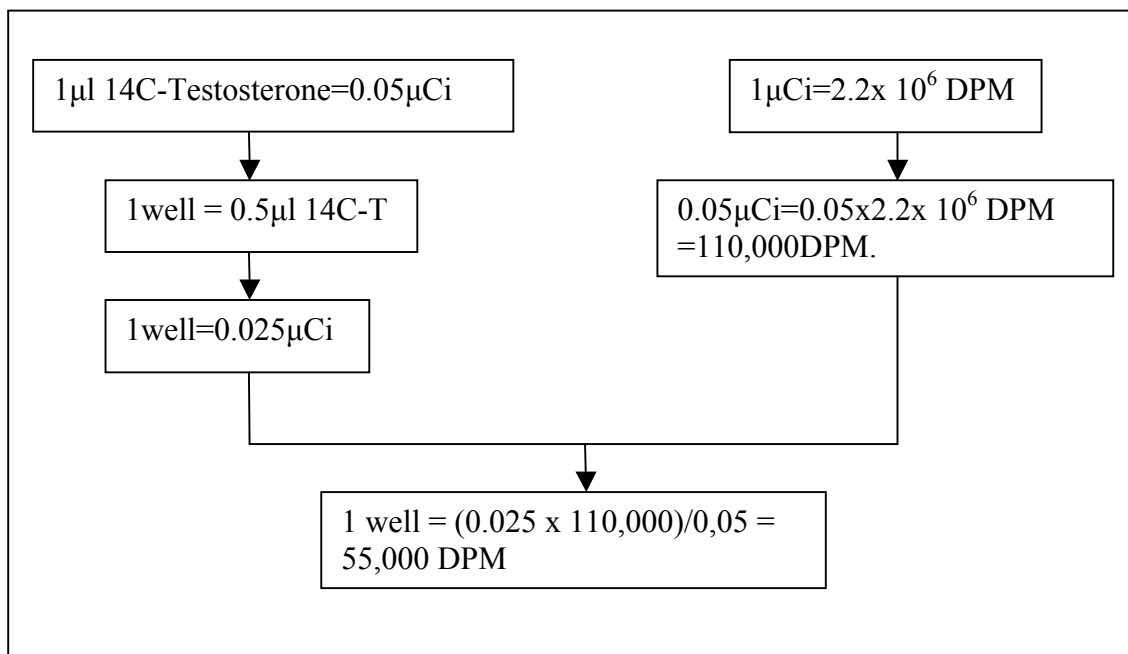


Figure 15: Matematical conversion of radioactivity units (Ci) into DPM.

A **quench value** for each channel was obtained by dividing the total DPM per well (55,000) by the counts recovered per channel (Figure 16)

$$\text{Quench (Q)} = \frac{55,000}{\text{Total counts recovered per channel}}$$

Figure 16: Formula for calculating the quench value.

In order to account for the **analytical losses** during the process of extraction, the percentage of recovery was calculated in a previous experiment with two series of experiments (series M and E), each of 16 experimental samples. 0.5µl of radio-labelled androgen (14C-testosterone) was added to each tube of the M series after the extraction procedure, while the addition of 14C-T to the E series was done prior to the extraction procedure. Each sample in the E and M series consisted of 1ml of Eagle's MEM + 10% FBS. The samples from both series were extracted with ethyl acetate (1ml x 2), then evaporated and solubilized in chloroform (80µl). They were then spotted on TLC plates and run once in benzene:acetone (4:1 v/v) solvent system. The mean value for isotope detected from the M and E series were obtained.

The percentage of recovery after an extraction procedure was calculated dividing the mean value for isotope detected in series E by the mean value for isotope in series M and multiplying it by 100. The result obtained was 70%; therefore, this value was used in all subsequent experiments when accounting for analytical losses (Figure 17).

$$\text{Analytical losses} = \frac{\text{Mean value for isotope detected in series E}}{\text{Mean value for isotope detected in series M}} \times 100 = 70\%$$

Figure 17: Mathematical calculation of analytical losses.

Thus, for each metabolite a **corrected DPM (X)** was calculated by multiplying the counts per minute of each metabolite by the quench value of its channel and by 70% (figure 18)

$$\text{Corrected DPM} = X = \frac{\text{Counts per minute} \times Q \times 100}{70}$$

Figure 18: Calculation of corrected DPM

In order to handle the data, we needed to convert the number of corrected DPM (X) to picomols (pmols) of metabolite. This was done by using the specific activity and the number of DPM.

The number of corrected DPM measured in μCi , was obtained by dividing X by 2.2×10^6 . The specific activity of $1\mu\text{mol}$ was $58\mu\text{Ci}$; therefore, in $1\mu\text{Ci}$ there was $1/58\mu\text{mol}$.

The last step was the conversion of the corrected DPM from μCi to pmol . This was done by dividing the number of corrected DPM by 2.2×10^6 and by 58, and multiplying it by 10^6 . That resulted in X divided by 127.6 (Figure 19).

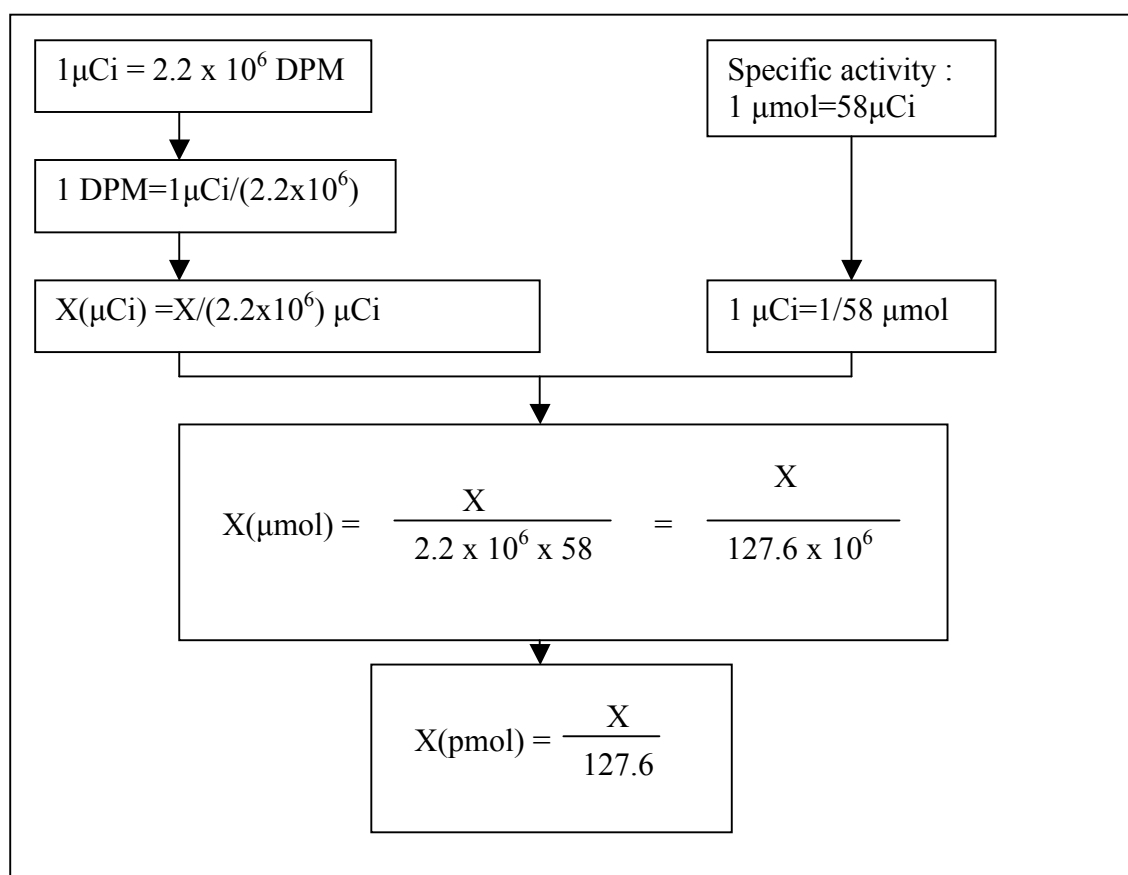


Figure 19: Conversion of DPM to pmol.

In each well we had added 1 ml of MEM; therefore, the amount of picomol obtained was per millilitre (pmol/ml).

Confirmation of the identity of metabolites

The identity of the formed metabolites was confirmed using the mobility of cold standards added to the samples. The carrier steroids added to the experiments were DHT, 4-androstenedione (4-A), testosterone (T) and diols (D). A small amount of each cold steroid (DHT, 4-A, T and D) was weighed and dissolved separately in ethanol for preparation of a solution at a concentration of 1 µg/µl. An equal amount of solution from each cold steroid was added in order to prepare a mixed solution of cold steroids. Then, 100µl of cold steroids were added into each sample. Apart from using the TLC in a benzene acetone solvent for separation of metabolites, they were also tentatively identified, by using the mobilities of added cold steroid standards, disclosed in iodine.

The TLC plate was placed in a covered tank containing iodine crystals, and the iodine-stained steroids were marked for comparison with the position and the pattern of separated metabolites identified by the radioisotope scanner. Further confirmation of the authenticity of steroid metabolites was established by carrying out gas chromatography-mass spectrometry (g.c-m.s).

Characterization of steroid metabolites by Gas Chromatography-Mass Spectrometry

It was important to confirm the identity of DHT, as it is the most significant biologically active testosterone metabolite in stimulating fibroblasts synthetic activity (Normington & Russell 1992). The confirmation of the identity of DHT was carried out in the previous experiments. Several incubations were performed with unlabelled testosterone (10^{-6} mol/l) and after the metabolites were extracted, the identity of 5 α -DHT as a metabolite in the dried extracts was confirmed by combined gas chromatography-mass spectrometry (courtesy of Prof. A.I. Mallet, St. Thomas' Hospital, London, UK), after derivatisation to pentafluorobenzyloxime trimethyl silyl ether (PFBO/TMS).

The derivatised biological material had a molecular ion (557) and mass spectral fragmentation pattern identical to those of authentic PFBO/TMS ether of 5 α -DHT, but at lower levels, due to smaller concentrations of steroid. These procedures have been documented previously, with the ionic fragmentation pattern in graphic form (Soory 1995).

2.10. STATISTICAL ANALYSIS

Means values were obtained from each of the metabolites isolated from incubations of human periosteal fibroblasts and osteoblasts in duplicate (n=8). The cell lines were not pooled and each cell line relates to the subject. The control incubation in the absence of testing agents served as the comparison for test incubations in the cell lines studied for each experimental set-up. Standard deviations from the mean values will be shown in the figures. One-way ANOVA was used for significance testing (Altman 1999).

Chapter IV.

RESULTS

1. Determination of optimal concentrations.
2. Setting up experiments.

1. DETERMINED OPTIMAL CONCENTRATIONS.

Human periosteal fibroblasts (HPF) metabolised ^{14}C -Testosterone mainly to diols, 4-androstenedione (4A) and 5α -dihydrotestosterone (DHT). The results offered here are based on the levels of DHT obtained.

1.1. Effect of serial concentrations of coenzyme Q10 on ^{14}C -Testosterone by periosteal fibroblasts

The results obtained are shown in table 1. The yields of DHT were increased in response to all six concentrations of CoQ used (5, 10, 20, 30 and 50 $\mu\text{g/ml}$) by 15.4, 25.8, 37.4, 33.8 and 15.9% respectively. The maximum levels of DHT were obtained with a concentration of CoQ of 20 $\mu\text{g/ml}$ (Figure 20). Therefore, this concentration is selected as the optimum one to be used in the next set of experiments.

[CoQ] ($\mu\text{g/ml}$)	[DHT](pmol/ml)
0	11.20
5	12.93
10	14.09
20	15.39
30	14.99
50	12.98

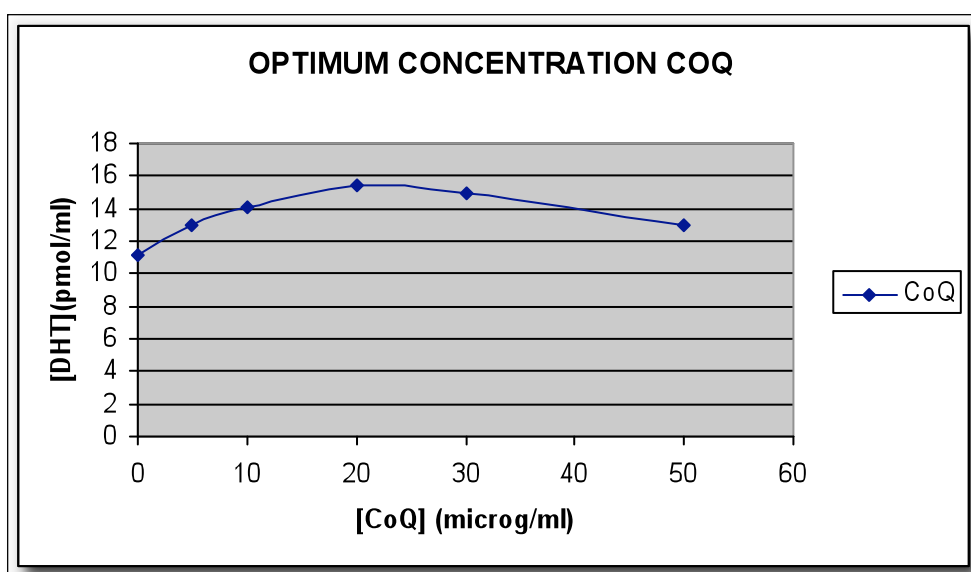


Figure 20: DHT production in relation to different concentrations of CoQ.

1.2. Effect of serial concentrations of Pycnogenol® on ¹⁴C-Testosterone by periosteal fibroblasts

The results obtained are shown in figure 21. Serial concentrations of Pycnogenol® (50, 100, 150, 200 and 300 µg/ml) caused an increase on the DHT levels in all cases (57.5, 33.6, 86.2, 93.7 and 38.2% respectively). There were equal amounts of DHT produced by two different concentrations of Pycnogenol® (150 and 200 µg/ml). We select the first one to be used in the next set of experiments (150 µg/ml).

[Pyc] (µg/ml)	[DHT] (pmol/ml)
0	9.33
50	14.70
100	12.46
150	17.38
200	18.08
300	12.90

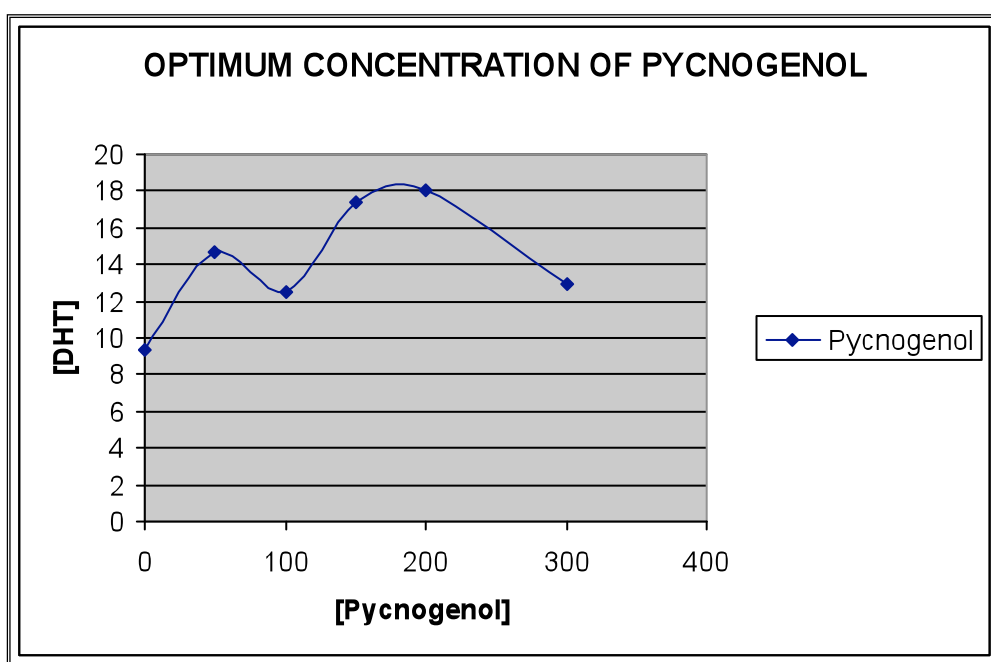


Figure 21: Levels of DHT in relation to different concentrations of Pycnogenol®

1.3. Effect of serial concentrations of phytoestrogens on ^{14}C -Testosterone by periosteal fibroblasts

The results obtained are shown in figure 22. There was a continuous increase in DHT production from cultures HPG with each concentration of phytoestrogens employed (10, 20, 30, 40 and 50 $\mu\text{g/ml}$). There were 33.9, 32.8, 32.2, 38.9 and 40.6% increases in DHT synthesis compared to control values. As it is shown, there was only a slight variation in the yields of DHT within the range of 10 and 40 $\mu\text{g/ml}$. Therefore, the first and last of the range (10 and 40 $\mu\text{g/ml}$) were the selected concentrations to be utilized later on.

[Phytoestrogens] ($\mu\text{g/ml}$)	[DHT] (pmol/ml)
0	10.07
10	13.49
20	13.38
30	13.32
40	13.99
50	14.16

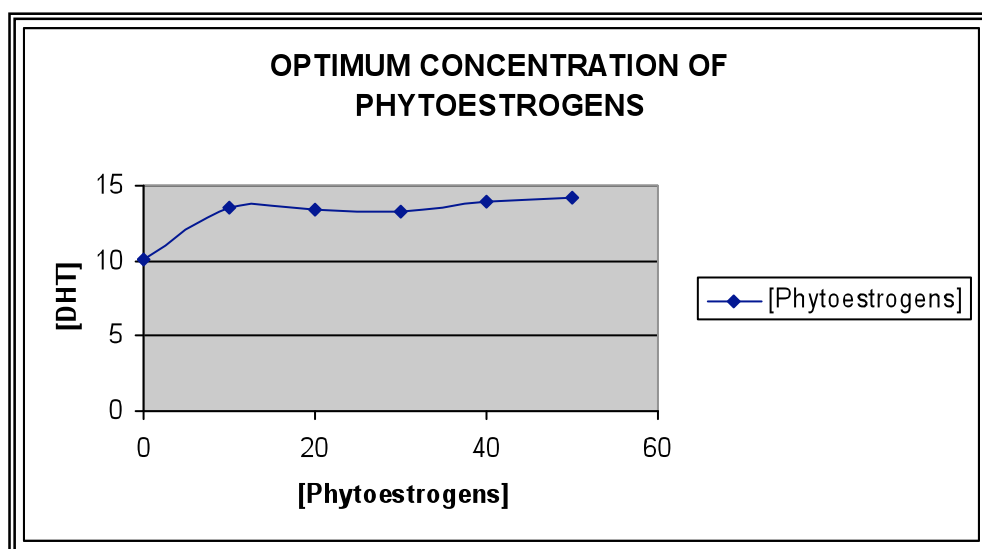


Figure 22: Effect of serial concentrations of phytoestrogens on DHT production.

2. EXPERIMENTAL RESULTS

2.1. Effect of coenzyme Q10, Pycnogenol® and nicotine, alone and in combination on the metabolism of 14C-testosterone in periosteal fibroblasts

Duplicate incubations of CoQ (20µg/ml), Pycnogenol® (150µg/ml) and nicotine (250µg/ml), alone and in combination of CoQ and nicotine, and, CoQ and Pycnogenol® were performed in cultured human periosteal fibroblasts. The substrate 14C-testosterone was metabolized to DHT, 4A and D.

DIHYDROTESTOSTERONE (DHT)

The formation of DHT was increased by 34.3 and 65.8% in response to CoQ (20µg/ml; n=8; p<0.005) and Pycnogenol (150µg/ml; n=8; p<0.001), respectively. Nicotine (250µg/ml) caused 23.8% decrease in DHT production comparing it to control values (n=8; p<0.05).

The combination of nicotine at 250 µg/ml with CoQ (20µg/ml) or Pycnogenol ® (150 µg/ml) increased the yields of DHT by 84.4 and 66.5%, respectively, compared with incubation with nicotine alone (n=8; p<0.001 and n=8; p<0.05 respectively).

In addition, these values were increased over baseline controls as well (40.5% and 26.7%, respectively), although, only statistical significance was found for the association of CoQ with nicotine (figure 23)

4-ANDROSTENEDIONE (4A)

It seemed to be a tendency of decreasing the yields of 4A after incubation with all testing agents, alone and in combination, except for CoQ and nicotine alone. However, all of these results were not statistically significant.

CoQ showed a stimulatory effect on 4A production of 73.8% compared to control values. The combination of CoQ with nicotine (250µg/ml) caused an inhibitory effect of 12.85% on 4A yields, compared with nicotine alone.

There was a 39.7% decrease in 4A synthesis compared to control values in relation to a concentration of Pycnogenol® of 150µg/ml. When combined with nicotine (250µg/ml), the yields of DHT were decreased by 33.7%, compared with incubation with nicotine alone. Nicotine alone caused a slight increase in 4A synthesis (6.3%) (Figure 24)

DIOLS (D)

There was a general trend of reducing diols synthesis when incubation with the different testing agents.

All testing agents alone (CoQ, Pycnogenol® and Nicotine) caused a decrease in synthesis of diols by cultured human periosteal fibroblasts (3.7, 11.8 and 0.6% respectively) compared to control incubations, although this decrease was not statistically significant.

The combination of nicotine with CoQ slightly increased yields of D by 1.7% over nicotine alone, and the combination of nicotine with Pycnogenol® caused an increase of 14.5% in diols synthesis. However, none of these results were statistically significant (figure 25)

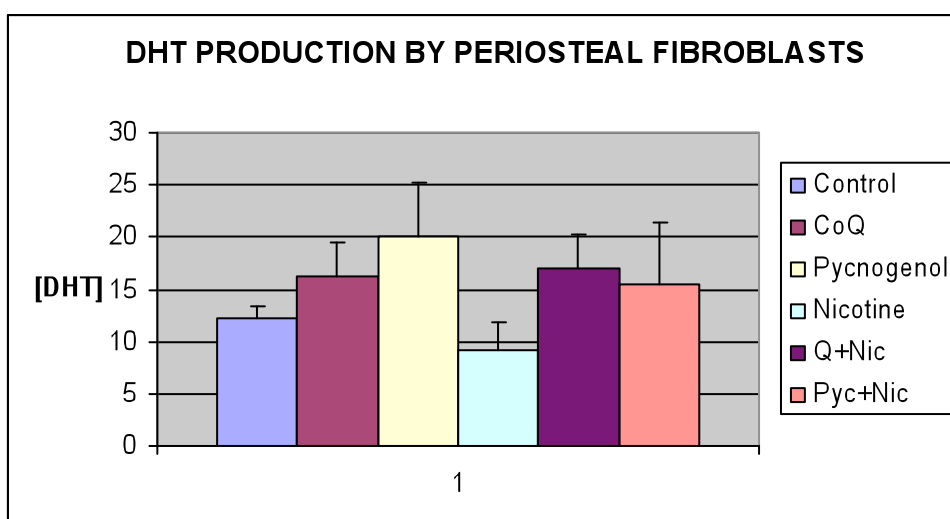


Figure 23: Yields of DHT synthesised by cultured human periosteal fibroblasts after incubation with CoQ (20µg/ml), Pycnogenol® (150µg/ml), nicotine (250µg/ml) alone and in combinations of CoQ + nicotine and Pycnogenol® + nicotine.

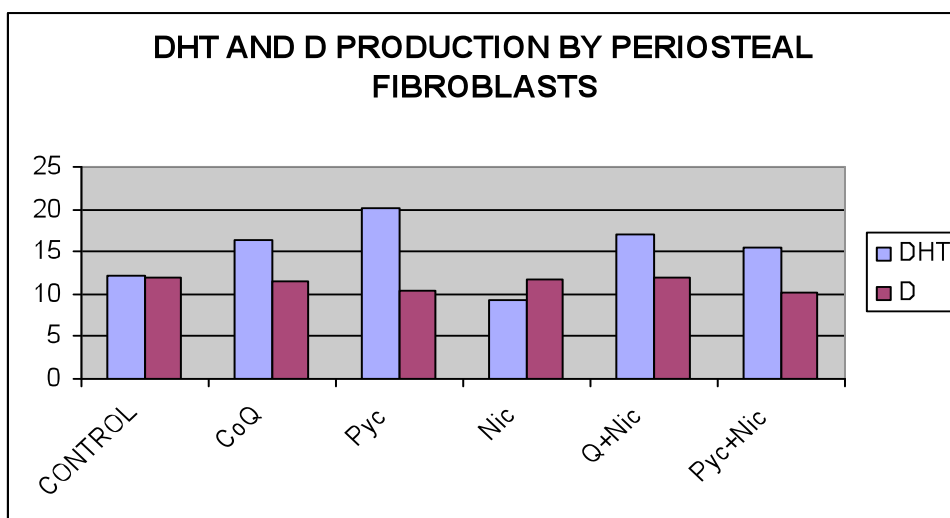


Figure 24: Yields of diols and DHT after incubation of human periosteal fibroblasts with CoQ10 (20 μ g/ml), Pycnogenol (150 μ g/ml) and nicotine (250 μ g/ml) alone and in combination of CoQ + nicotine and Pycnogenol® + nicotine.

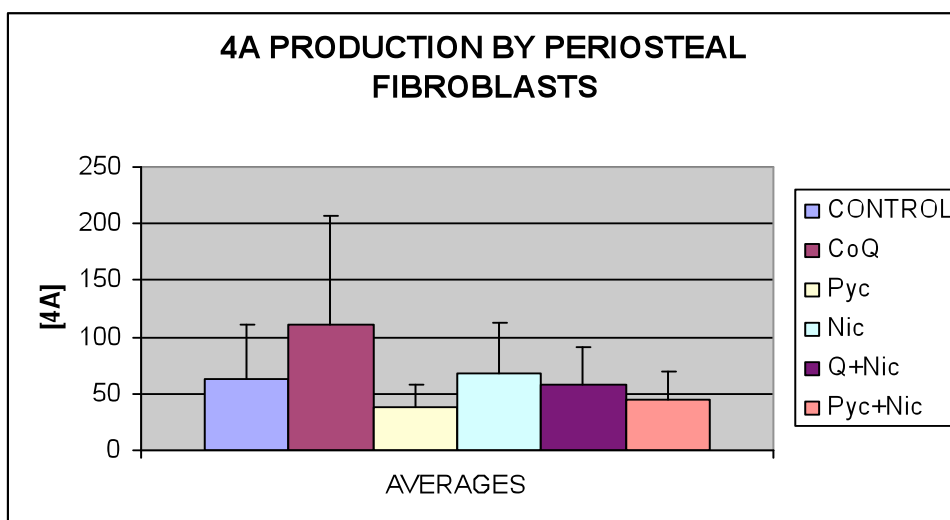


Figure 25: Yields of 4A after incubation of human periosteal fibroblasts with CoQ10 (20 μ g/ml), Pycnogenol (150 μ g/ml) and nicotine (250 μ g/ml) alone and in combination of CoQ + nicotine and Pycnogenol® + nicotine.

2.2. Effect of coenzyme Q10, Pycnogenol® and nicotine, alone and in combination on the metabolism of 14C-testosterone in MG63 osteoblasts

Osteoblasts from a cell line (MG-63) were incubated with CoQ (20µg/ml), Pycnogenol (150µg/ml) and nicotine (250µg/ml) alone and in combination of CoQ + nicotine and Pycnogenol® + nicotine. The androgen substrate 14C-Testosterone was metabolized mainly to DHT, 4A and D.

DIHYDROTESTOSTERONE (DHT)

Figure 26, shows the metabolic conversion of 14C-testosterone to DHT by human osteoblasts in response to CoQ, Pycnogenol® and nicotine, alone and in combination.

CoQ (20µg/ml) and Pycnogenol® (150µg/ml) showed consistent stimulatory effects on DHT synthesis of 53.9 and 97.3%, respectively, compared to control values (n=8; p<0.05 and p<0.005).

The yields of DHT were significantly reduced (43.3%) in response to nicotine (250µg/ml) compared to control incubations (n=8, p<0.05).

The combination of nicotine with CoQ or Pycnogenol® caused 1.3 and 1.5-fold increases in DHT production over incubation with nicotine alone (n=8; p<0.001), respectively, being these values above controls (29.4% and 42.7%, respectively; n=8; p<0.05).

4-ANDROSTENEDIONE (4A) AND DIOLS (D)

The incubation of cultured osteoblasts with CoQ, Pycnogenol® and nicotine, alone and in combination of nicotine with CoQ or Pycnogenol® resulted in a general trend of decreasing 4A synthesis (30.7, 49.2, 47.6, 62.4 and 68.2% compared to control values, respectively), while there was a tendency for the yields of diols to increase (9, 127.4, 69.7, 120.7 and 221.4% compared to control values, respectively). These results were predominantly significantly at a level of p<0.05, except for CoQ alone and in combination with nicotine (figure 27 and 28)

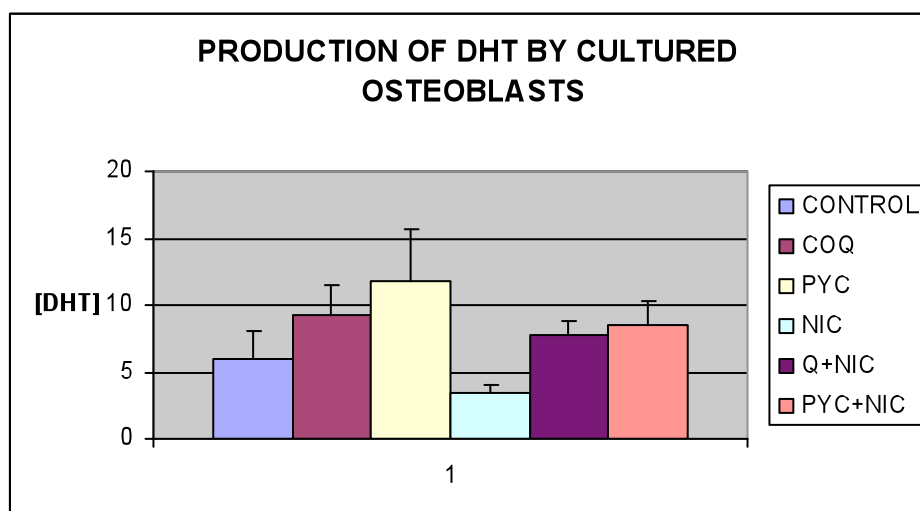


Figure 26: Metabolism of ^{14}C -Testosterone into DHT by cultured osteoblasts after incubation with CoQ (20 $\mu\text{g/ml}$), Pycnogenol® (150 $\mu\text{g/ml}$) and nicotine (250 $\mu\text{g/ml}$) alone and in combination of CoQ + nicotine and Pycnogenol® + nicotine.

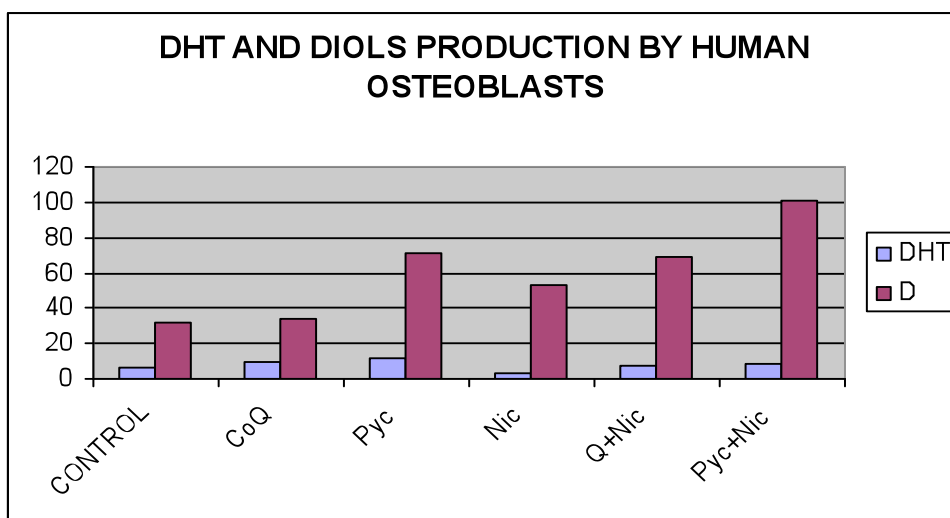


Figure 27: Comparison between diols levels and DHT yields after incubation of human osteoblasts with CoQ10 (20 μ g/ml), Pycnogenol (150 μ g/ml) and nicotine (250 μ g/ml) alone and in combination of CoQ + nicotine and Pycnogenol® + nicotine.

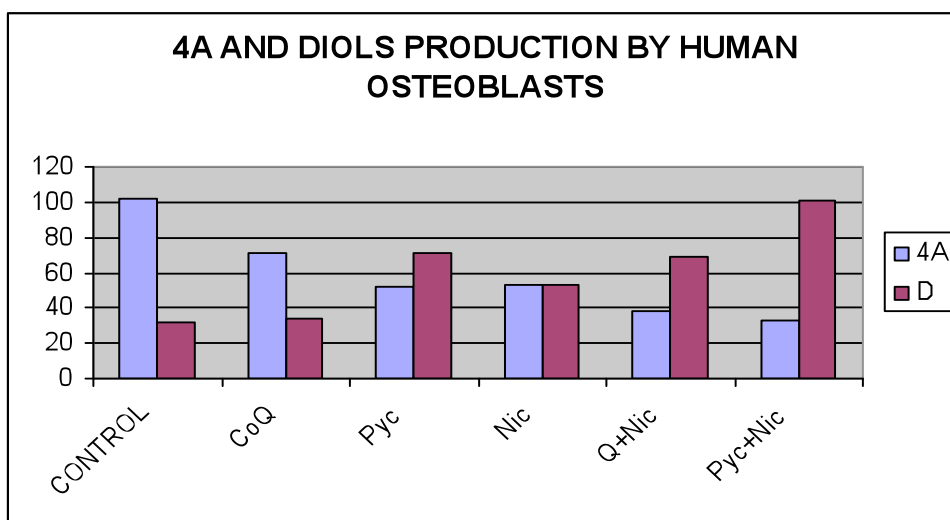


Figure 28: Yields of diols and 4A incubation of human osteoblasts with CoQ10 (20 μ g/ml), Pycnogenol (150 μ g/ml) and nicotine (250 μ g/ml) alone and in combination of CoQ + nicotine and Pycnogenol® + nicotine.

Comparison of the metabolism of ^{14}C -testosterone between cultured human osteoblasts and periosteal fibroblasts.

Only the results concerning DHT production will be shown here.

Figure 29 represents the metabolic conversion of ^{14}C -Testosterone to DHT by human cultured osteoblasts compared to that of cultured human periosteal fibroblasts, in response to the same concentration of CoQ (20 $\mu\text{g/ml}$), Pycnogenol® (150 $\mu\text{g/ml}$), nicotine (250 $\mu\text{g/ml}$), CoQ + nicotine and Pycnogenol® + nicotine.

Periosteal fibroblasts showed a higher threshold of activity than osteoblasts cells, with greater amount of DHT produced. However, considering responses to individual agents, there were higher percentages of increases and decreases in human cultured osteoblasts than in cultured HPF (Figure 30).

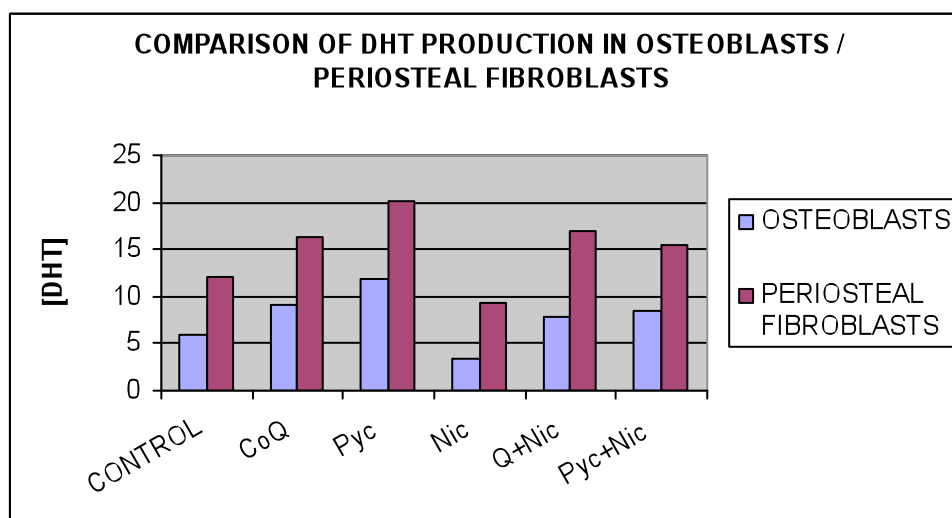


Figure 29: This graph shows the yields of DHT produced by human cultured osteoblasts after incubation with CoQ, Pycnogenol®, nicotine, CoQ + Nicotine and Pycnogenol® + nicotine compared to the yields of DHT produced by human cultured fibroblasts after incubation with the same testing agents.

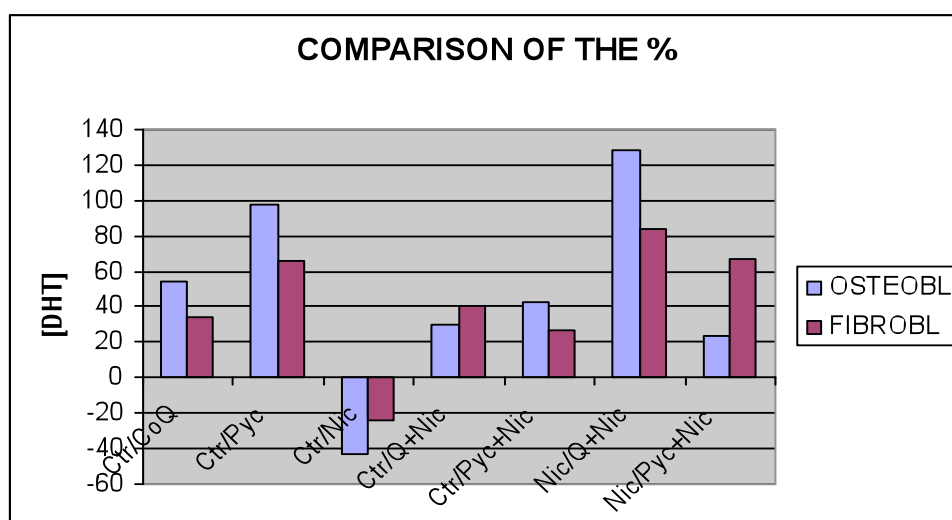


Figure 30: This graph shows the differences in DHT production by human cultured osteoblasts and human cultured periosteal fibroblasts compared to control values.

2.3. Effect of phytoestrogens and nicotine, alone and in combination on androgen metabolism using ^{14}C -testosterone as substrate in periosteal fibroblasts

Two different concentrations of phytoestrogens (10 and $40\mu\text{g/ml}$) and nicotine ($250\mu\text{g/ml}$), alone and in combination of phytoestrogens ($10\mu\text{g/ml}$) + nicotine and phytoestrogens ($40\mu\text{g/ml}$) + nicotine, were incubated with human cultured periosteal fibroblasts. ^{14}C -testosterone was mainly metabolised into DHT, 4A and D.

5 α -DIHYDROTESTOSTERONE (DHT)

Phytoestrogens, at concentrations of 10 and $40\mu\text{g/ml}$, caused a stimulatory effect on DHT synthesis. These increases were 80.3 and 66.3% respectively, compared to the control value ($n=8$; $p<0.001$ in both cases).

Nicotine showed consistent inhibitory effects on DHT synthesis by 33.7% ($n=8$; $p<0.005$).

The combination of nicotine with phytoestrogens at 10 and $40\mu\text{g/ml}$ further stimulated the yield of DHT by 88.6 ($n=8$; $p<0.001$) and 99.9% ($n=8$; $p<0.005$) compared with incubations with nicotine alone. In addition these association showed an increase over control values by 25.1 ($n=8$; $p<0.05$) and 32.6% ($n=8$; $p=0.08$) (figure 31)

4-ANDROSTENEDIONE (4A) AND DIOLS (D)

The yields of 4A were significantly increased in response to all testing agents alone (Phytoestrogens at 10 and $40\mu\text{g/ml}$ and nicotine) by 54.4 ($n=8$, $p<0.05$), 59.1 ($n=8$; $p<0.005$) and 57.2% ($n=8$; $p<0.05$) respectively, compared to control values. The combination of phytoestrogens (10 and $40\mu\text{g/ml}$) with nicotine decreased 4A yields by 16.5 and 7% respectively comparing them to incubations with nicotine alone. However, the results were not statistically significant (Figure 32)

Only slightly changes in D yields were observed. None of them were statistically significant. There was a general trend of increasing diols synthesis by phytoestrogens (10 and $40\mu\text{g/ml}$) and of decreasing diols yields by nicotine alone or in combination with phytoestrogens (Figure 33)

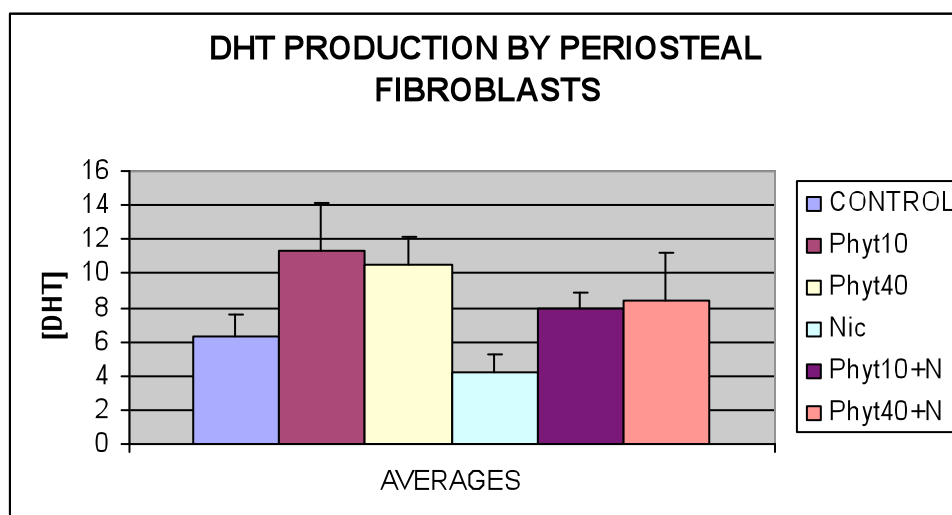


Figure 31: Metabolic conversion of ^{14}C -Testosterone to DHT by human cultured periosteal fibroblasts in response to two different concentrations of phytoestrogens (10 and $40\mu\text{g/ml}$) and nicotine, alone and in combination.

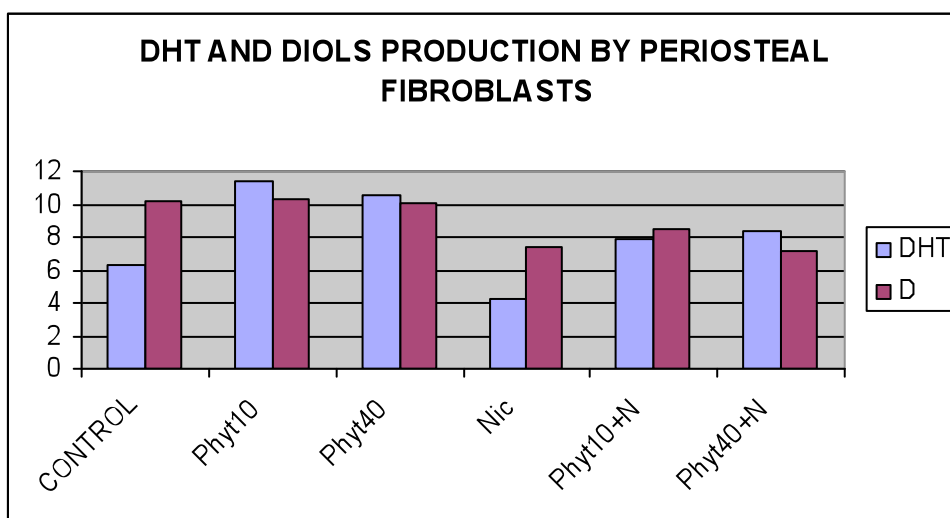


Figure 32: Comparison between diols and DHT yields after incubation of human periosteal fibroblasts with two different concentrations of phytoestrogens (10 and 40 μ g/ml) and nicotine (250 μ g/ml) alone and in combinations of nicotine with phytoestrogens at concentrations of 10 μ g/ml or 40 μ g/ml.

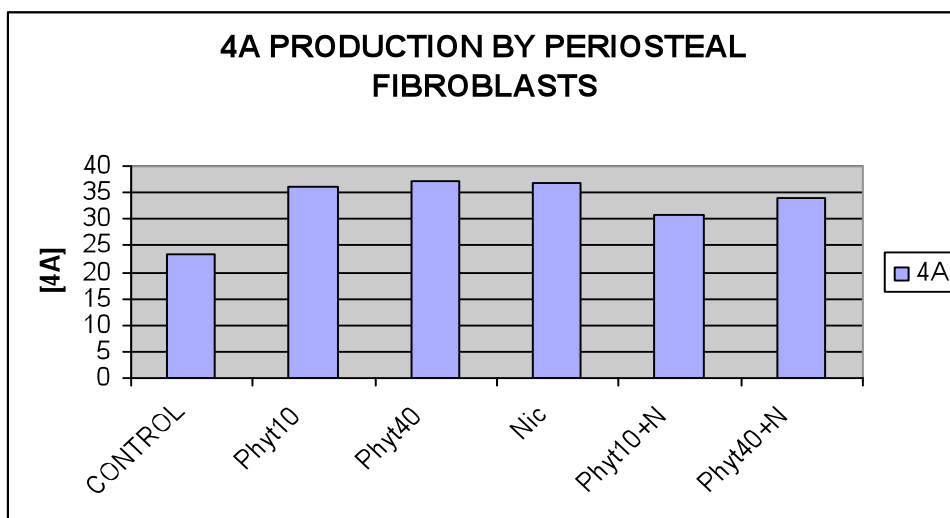


Figure 33: Yields of 4A after incubation of human periosteal fibroblasts with two different concentrations of phytoestrogens (10 and 40 μ g/ml) and nicotine (250 μ g/ml) alone and in combinations of nicotine with phytoestrogens at concentrations of 10 μ g/ml or 40 μ g/ml.

2.4. Effect of phytoestrogens and nicotine, alone and in combination on androgen metabolism using ¹⁴C-testosterone as substrate in MG63 osteoblasts

Osteoblasts from the cell line MG-63 were incubated with two different concentrations of phytoestrogens (10 and 40µg/ml) and nicotine (250µg/ml) alone and in combination of nicotine with phytoestrogens at concentrations of 10µg/ml or 40µg/ml. The androgen substrate ¹⁴C-testosterone was metabolized mainly to DHT, 4A and D.

5α-DIHYDROTESTOSTERONE (DHT)

Incubations of cultured human osteoblasts with phytoestrogens (10 and 40µg/ml) resulted in a consistent stimulatory effect on DHT synthesis of 88.7 and 171.7% respectively, compared to control incubations (n=8, p<0.001).

Nicotine (250µg/ml) inhibited the formation of DHT by 47.4% (n=8; p<0.005) over control values.

The combination of nicotine with phytoestrogens at 10µg/ml and 40µg/ml caused 2.5 and 2.1-fold increases in the formation of DHT by cultured human osteoblasts compared to incubations with nicotine alone (n=8; p<0.001) (figure 34).

4-ANDROSTENEDIONE (4A) AND DIOLS (D)

There was a general tendency of increased yields of both metabolites (4A and D) after incubation with all testing agents alone (phytoestrogens 10 and 40µg/ml, and nicotine 250µg/ml) compared to control values. These data were only significant for 4A (n=8; p<0.05).

The combination of nicotine with phytoestrogens (10 or 40µg/ml) resulted in statistically non-significant increases in 4A and D yields compared with incubations with nicotine alone (figures 35 and 36).

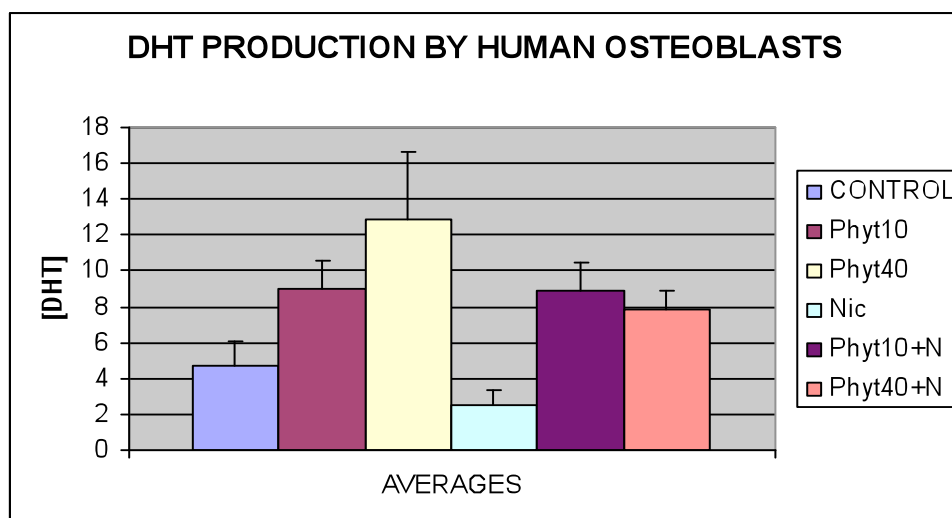


Figure 34: Metabolism of ^{14}C -Testosterone to DHT by cultured osteoblasts after incubation with two different concentrations of phytoestrogens (10 and 40 $\mu\text{g/ml}$) and nicotine (250 $\mu\text{g/ml}$) alone and in combinations of nicotine + phytoestrogens 10 $\mu\text{g/ml}$ and nicotine + phytoestrogens 40 $\mu\text{g/ml}$.

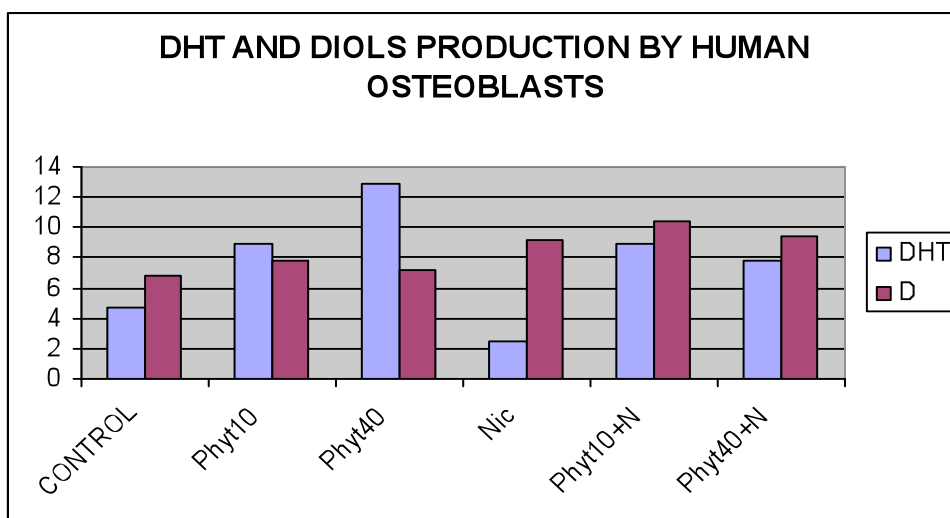


Figure 35: Comparison between diols and DHT yields after incubation of human osteoblasts with two different concentrations of phytoestrogens (10 and 40 μ g/ml) and nicotine (250 μ g/ml) alone and in combinations of nicotine with phytoestrogens at a concentration of 10 μ g/ml or 40 μ g/ml.

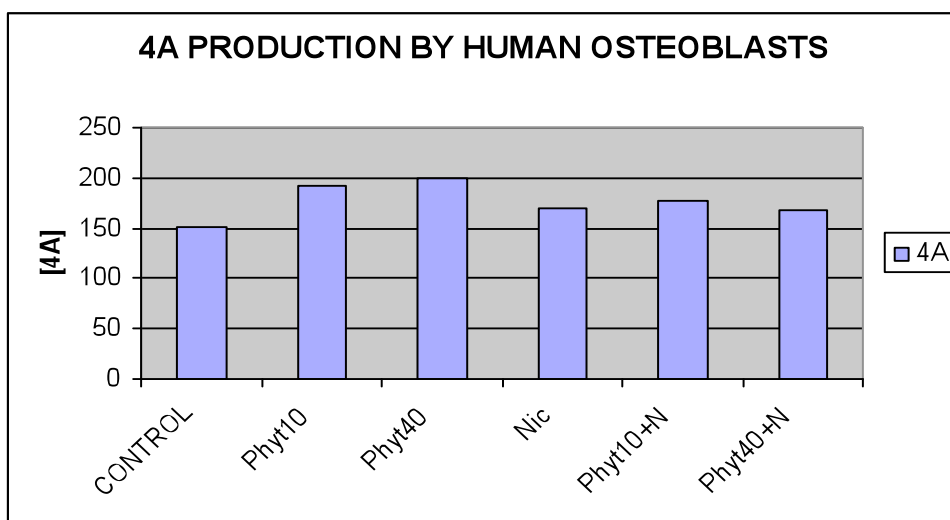


Figure 36: Yields of 4A after incubation of human osteoblasts with two different concentrations of phytoestrogens (10 and 40 μ g/ml) and nicotine (250 μ g/ml) alone and in combination of nicotine with phytoestrogens at a concentration of 10 μ g/ml or 40 μ g/ml.

Comparison of DHT production between cultured human periosteal fibroblasts and MG63 osteoblasts.

Figure 37 shows the differences in DHT production between cultured human periosteal fibroblasts and osteoblasts in response to two different concentration of phytoestrogens (10 and 40µg/ml), nicotine (250µg/ml) alone and in combination of nicotine and phytoestrogens 10µg/ml or 40µg/ml.

There was not a clear difference between both types of cells regarding the total amounts of DHT produced. However, as shown earlier, there were higher percentages of increases and decreases in human cultured osteoblasts than in cultured human periosteal fibroblasts (Figure 38).

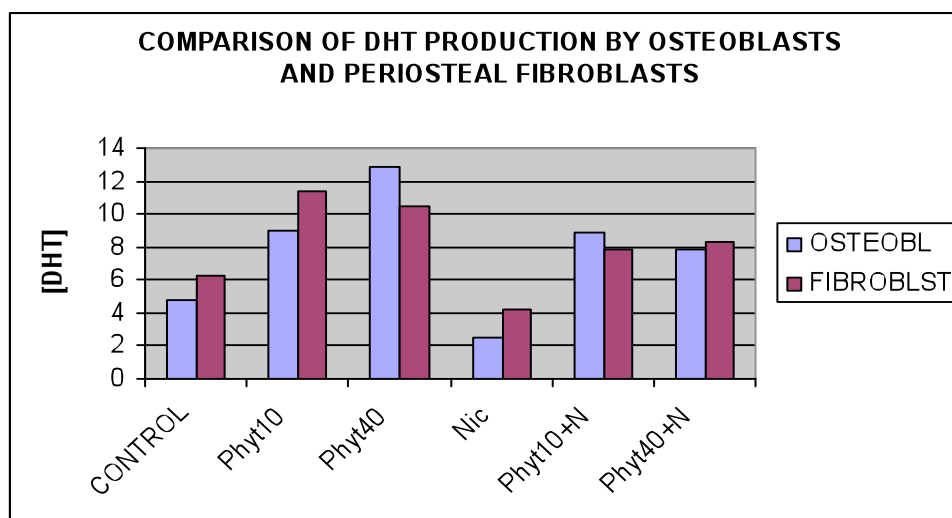


Figure 37: This graph shows the yields of DHT produced by human cultured osteoblasts after incubation with phytoestrogens (10 and 40 μ g/ml), nicotine (250 μ g/ml) alone and in combinations of nicotine and phytoestrogens 10 μ g/ml or 40 μ g/ml compared to the yields of DHT produced by human cultured fibroblasts after incubation with the same testing agents.

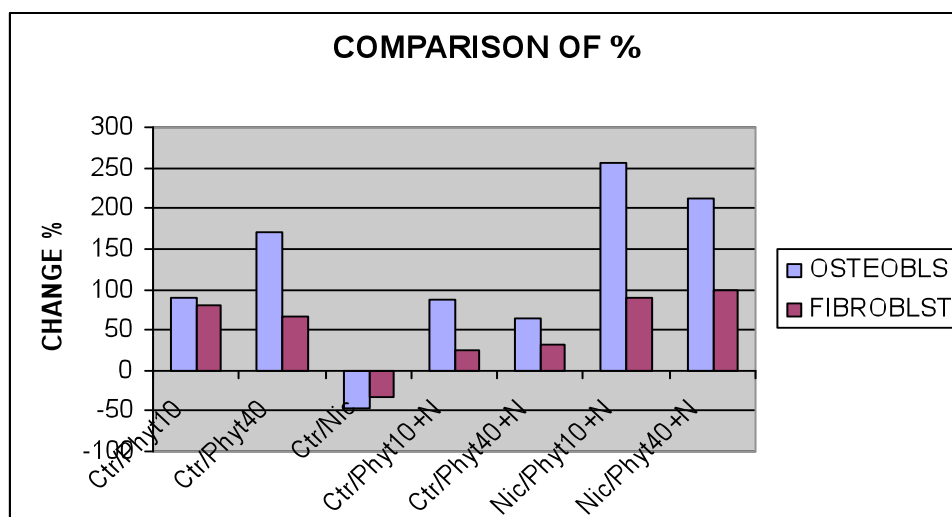


Figure 38: This graph shows the differences in DHT production by human cultured osteoblasts and human cultured periosteal fibroblasts compared to control values.

Chapter V.

DISCUSSION

1. Nicotine as an oxidative agent.
2. CoQ, Pycnogenol[®] and phytoestrogens.
3. DHT, 4 A and Diols.
4. Comparison of cells.
5. Clinical application in periodontal therapy.

In our investigation we attempted to determine the *in vitro* antioxidant / oxidant effects of different testing agents, looking for an *in vivo* application to patients with periodontal diseases. Therefore, we designed an *in vitro* study in which two different cell types, human osteoblasts and human periosteal fibroblasts, were incubated with previously determined optimal concentrations of two oxidant agents (nicotine and glucose) and three antioxidants (CoQ, Pycnogenol® and phytoestrogens) with a defined activity in the treatment of several systemic diseases (diabetes mellitus, arthritis rheumatoid) (Droge 2002, Green et al. 2004, Hagfors et al. 2003, Jaswal et al. 2003, Robertson 2004, Scott & King 2004, Taniyama & Griendling 2003).

The incubations with nicotine and glucose (oxidant agents) resulted in a dramatic reduction in the levels of DHT, a physiologically active androgen implicated in stimulating matrix-forming cells (Vittekk et al. 1979) and with documented evidence of anabolic activity (Coxam et al. 1996, Tilakaratne & Soory 2000).

By contrast, when incubations with antioxidants were done, the levels of DHT not only recovered to their control values, but they also overcame the effects of the oxidants. This suggests that the catabolic effects of nicotine and glucose could be reversed by the addition of antioxidants such as CoQ, Pycnogenol® or phytoestrogens.

1. Nicotine as oxidant agent

Periodontitis is an inflammatory condition characterized by the release of great amounts of ROS by PMN cells (“oxidative burst”) (Droge 2002, Sen et al. 2002). This increase in oxidative stress in tissues has been proposed as one of the main mechanisms involved in the pathogenesis of periodontal disease (Sculley & Langley-Evans 2003). Several efforts have been made in order to find new therapeutic approaches to it. However, in determined groups of patients, such as smokers, conventional measures have failed to obtain good results. Some authors have focused their investigations on the effects of nicotine in periodontal tissues, proposing tobacco as a risk factor with detrimental effects (Argentin & Cicchetti 2004, van der Vaart et al. 2004, Yildiz et al. 1998, Yildiz et al 1998).

Previous reports have revealed that smokers have poorer periodontal status compared to that of non-smokers (Johnson & Hill, 2004, Bergstrom 2004, Rivera-Hidalgo 2003). These observations can be confirmed with the results obtained here, where the incubation of cultured human periosteal fibroblasts and osteoblasts with nicotine at a concentration of 250µg/ml resulted in a significant decrease in DHT yields compared to control values (from 23.8 to 47.4% depending on the type of cell and experiment). Our results are in agreement with those of Soory & Suchak (2003). They observed an inhibitory effect of 5α-reductase activity on cultured gingival and oral periosteal fibroblasts after incubations with nicotine (30, 50, 100µg/ml).

However, a dichotomous effect of nicotine in tissues has been proposed (Giannopoulou et al. 2001, Gullihorn et al. 2005, Sooy & Suchak 2003, Walker et al. 2001). Soory & Suchak, 2003, reported a stimulatory effect on 5α-R activity when incubations with low concentrations of nicotine (1-5µg/ml) were made.

The stimulatory effect of nicotine at low doses has also been demonstrated in bone cell cultures (Gullihorn et al. 2005, Walker et al. 2001) and in gingival fibroblasts (Giannopoulou et al. 2001). Gullihorn et al. (2005) reported an enhancement in the metabolic activity (increases in alkaline phosphatase activity and in collagen and protein synthesis) in a clonal osteoblasts-like osteogenic cells line (murine mC3T3-E1 cells) after incubation with nicotine concentrations ranging from 12.5 to 250ng/ml. Giannopoulou et al. (2001) observed an inhibition in proliferation in gingival fibroblasts obtained from patients with periodontal disease, after incubation with epithelial cells treated with nicotine at concentrations of 100 and 500µg/ml, while lower concentrations (1µg/ml) showed a stimulatory effect.

All these results serve to justify the biphasic effect of nicotine in both matrix stimulatory steroid syntheses as well as in cell proliferation and metabolic activity, with a threshold above which nicotine exhibits anti-proliferative effects and an inhibition in 5α-reductase activity (1-5µg/ml).

We have employed an effective concentration of 250µg/ml of nicotine in all the procedures. It resulted in a significant decrease in DHT production in all cases and as a consequence an increase in oxidative stress in the cells studied.

The mechanism by which nicotine exert its detrimental effects is not completely understood. Some *in vitro* studies have tested the effects of nicotine not only in oral

tissues (Argentin & Cicchetti 2004, Chang et al. 2002, Katz et al. 2005) but also in all body tissues (Cigremis et al. 2004, Gullihorn et al. 2005, Yamaya et al. 1995). Although several hypotheses have been proposed, the role of nicotine as an oxidantive agent is probably the most studied one.

Argentin & Cicchetti (2004) demonstrated that human gingival fibroblasts from a cell line incubated during a period of 24 hours with nicotine (1 μ M) showed an increase in ROS production. When these cells were pre-treated with antioxidants (N-acetylcysteine: 1 μ M or Catalase: 50 μ M) two hours prior to the addition of nicotine, the levels of ROS obtained were diminished. This confirms that nicotine is able to cause oxidative stress in oral tissues and suggests a potential role for antioxidants in conferring protection against DNA damage.

Alterations in cellular glutathione (GSH) levels have been proposed as another mechanism responsible for the deleterious effects attributed to nicotine. GSH is a small tripeptide responsible for the regulation of the intracellular levels of ROS, and therefore, acts as an antioxidant. Total GSH involves GSH and GSSG. During oxidative stress, GSH peroxidase reduces GSH to its oxidizing form GSSG (Chang et al. 2003). Nicotine-induced GSH depletion has been demonstrated in cultured human periodontal ligament fibroblasts (HPLF) (Chang et al. 2002, Chang et al. 2003) and in rat kidney tissues (Cigremis et al. 2004). Cigremis et al. (2004) reported a decrease in oxidised glutathione (GSH) in rat kidney tissues after a 6-month exposure to cigarette smoke. The histopathological analysis revealed an advanced hydropic degeneration of kidney tubules. In the case of cultured HPLF, nicotine incubations (2.5-20mM) depleted GSH in a dose-dependent manner (Chang et al. 2003). Pretreatment with OZT, a precursor of cysteine which promotes the synthesis of GSH, prevented the cytotoxic effects induced by nicotine alone; while the use of some antioxidant such as catalase or superoxide dismutase, did not show any protective effect over nicotine-induced cytotoxicity (Chang et al. 2002). However, in the study of Chang et al. (2003), the decrease in GSH levels was not accompanied by an increase in GSSG levels. This indicates that nicotine could alter the ratio GSH / GSSG in human PDLFs without having a connection with oxidative stress.

These results could serve to explain another potential mechanism by which nicotine could exert its effects in periodontal tissues. It would make cells more

vulnerable to other reactive agents present in dental plaque, via depletion in GSH levels (Chang et al. 2002).

Tanko & Christiansen (2004) have suggested another potential mechanism of action for nicotine. They proposed that part of the detrimental effect of smoking in bone metabolism is mediated by an adverse influence on sex-steroid metabolism, and in particular by an estrogen-lowering effect.

It is worth taking into account that epithelial cells are the first ones to get in contact with nicotine. They act as a barrier limiting the contact of nicotine with deeper cells, such as fibroblasts or osteoblasts. However, in inflamed gingiva affected by periodontal disease, the intercellular spaces may be wider, thus permitting the penetration of nicotine through the epithelial barrier, and allowing a direct contact with fibroblasts (Giannopoulou et al. 2001).

2. CoQ, Pycnogenol® and phytoestrogens as antioxidant agents

Once the oxidant effects of nicotine were confirmed both in cultured human osteoblasts and periosteal fibroblasts, we hypothesize that its detrimental effects could be minimized by the addition of some antioxidants. Therefore, CoQ, Pycnogenol® and phytoestrogens were selected to be used in this study. We first assessed the impact on the metabolism of ¹⁴C-Testosterone of each agent alone, and then we combined each antioxidant with nicotine.

2.1. Coenzyme Q10

The incubation of both types of cells with CoQ resulted in a significant increase in DHT yields (34.3 and 53.9% by periosteal fibroblasts and osteoblasts, respectively). The association of CoQ with nicotine increased DHT production by 84.4 and 128.2% in periosteal fibroblasts and osteoblasts, respectively, over incubations with nicotine alone. The levels of DHT achieved with this combination were even above those of control values (40.5 and 29.4% for periosteal fibroblasts and osteoblasts, respectively).

The ability of CoQ to increase the metabolism of androgens (¹⁴C-testosterone) in cultured human osteoblasts and periosteal fibroblasts serves to confirm the possible role of CoQ as an antioxidant in the treatment of tissues affected by inflammatory diseases

(periodontal diseases). That would imply a benefit in the healing process with a specific impact among smokers. We have demonstrated that CoQ was capable of inducing a recovery of the levels of DHT up to control values, and also with further increases.

CoQ has been proved to be a potent antioxidant in *in vitro* (Lee et al. 2005) and *in vivo* studies (Allema et al. 1995). It has been proposed as a potential treatment for mitochondrial diseases (Lee et al. 2005) and for vascular diseases (Wang et al. 2004) in type 2 diabetes patients (Chew & Watts 2004).

Hanioka et al. (1994) designed a clinical trial to assess the effects of topical application of CoQ in periodontal pockets. They reported that CoQ was able to improve adult periodontitis as a unique method or in combination with non-surgical therapy. However, the formulation of CoQ dispersed in soybean oil could be non-specific. It is well known that soybean oil is mainly composed of phytoestrogens (also tested here). They are potent antioxidants, and as a consequence, these results could reflect an effect erroneously attributed to CoQ, instead of to phytoestrogens or even to the combination of both agents.

It has also been shown that CoQ is able to inhibit mitochondrial depolarization (Papucci et al. 2003). Papucci et al. (2003) demonstrated in an *in vitro* study with rabbit corneal keratocytes, that pre-treatment with CoQ (10 μ M) 2 hours prior to the addition of a damaging agent capable of inducing apoptosis independently of the generation of ROS, resulted in an inhibition of apoptosis via maintaining the mitochondrial permeability transition pore in the closed formation.

2.2. Pycnogenol®

Incubations of cells with Pycnogenol® resulted in increases in DHT levels even higher than those obtained with CoQ (65.8 and 97.3% by periosteal fibroblasts and osteoblasts, respectively). When combined with nicotine and glucose, Pycnogenol® was also capable of neutralizing the effects of the oxidants and obtaining a recovery in DHT yields over control values.

The antioxidant properties of Pycnogenol® has been reviewed by Packer et al. (1999) and several authors have demonstrated its ability to scavenge ROS and NOS (nitrite species) (Blazso et al. 1997, Cho et al. 2001, Packer et al. 1999, Virgili et al. 1998). It has been shown to enhance other antioxidant systems such as α -tocopherol (10 μ g/ml) (Virgili et al. 1998, Kim et al. 2004) and even minimal concentrations (2.5 μ g/ml) have been shown to protect pigmental epithelium of the retina from lipid peroxidation induced in vitro by ferric iron (Ueda et al. 1996).

Pycnogenol® has been proposed as a treatment for skin diseases characterized by cutaneous inflammation. It has been applied to prevent ultraviolet (UV)-induced inflammation in human skin; in a group of 21 volunteers taking 1.1mg/kg/day during 4 weeks, increased the dose of ultraviolet (UV)-radiation necessary to induce erythema (Saliou et al. 2001). Experimental studies have tested the properties of topically applied Pycnogenol® in rats or mice (Blazso et al. 2004, Sime & Reeve 2004). These authors demonstrated its anti-inflammatory activity in either wound healing (Blazso et al. 2004) or in UV-irradiated tissues (Sime & Reeve 2004).

Pycnogenol® is also capable of dose-dependently down regulating IFN- γ -induced ICAM-1 expression in human keratinocytes at concentrations varying from 5 to 50 μ g/ml (BITO ET AL, 2000). ICAM-1 is responsible for the adhesion of T cell to human keratinocytes, and its levels are increased in gingival crevicular fluid from periodontal patients compared to healthy subjects (Hannigan et al. 2004); therefore, Pycnogenol® could be applied to damaged periodontal tissues in order to diminish their levels of ICAM-1, and help in the process of healing.

Another potential link with periodontal disease is found in the fact that Pycnogenol® exerts a strong inhibitory effect on the activity of metalloproteinase-1 (MMP-1), MMP-2 and MMP-9 (GRIMM, 2004). The production of some cytokines, such as interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-2 are also inhibited by Pycnogenol® (20 or 50 μ g/ml) in human T lymphocyte and in a murine cell line of monocyte-macrophages (Cho et al. 2001). This may in part explain the effect of Pycnogenol® in protecting periodontal tissues over immune-inflammatory reactions. Based on this hypothesis, Krimbrough et al. (2002) showed a reduction in the mean bleeding scores of 50% in a group of healthy patients after 14 days of chewing six pieces of Pycnogenol® (5mg)

daily. By contrast, Battino et al. (2005) could not demonstrate any protective effect of a Pycnogenol®-enriched toothpaste extract in human keratinocytes cell cultures 48 hours prior to challenge them with hydroxide peroxide (150 μ M).

The beneficial effects of Pycnogenol® in reducing oxidative stress in two different cell types have been proved here, however, more research is needed within this field. A specific device should be designed in order to obtain effective concentration of the agent in periodontal tissues.

2.3. Phytoestrogens

The highest values in DHT yields were obtained when incubations with phytoestrogens (10 and 40 μ g/ml) were made, with increases of 66.3 and 171.7% in periosteal fibroblasts and osteoblasts, respectively. When phytoestrogens were associated with nicotine, the production of DHT was enhanced by 99.9 and 255.2% by periosteal fibroblasts and osteoblasts, respectively, even increasing the levels of DHT over control values. The combination of phytoestrogens with a glucose-enriched medium resulted in a 1.5-fold increase in DHT yields over incubation with glucose alone, in MG63 osteoblasts.

Some of the beneficial effects of phytoestrogens have been attributed to their role as antioxidant agents (Rimbach et al. 2003). Genistein and daidzein (500, 200, 100, 1000 μ M) have been proved to mop up free radicals (hydroxyl and superoxide anion) in a murine cell line of monocyte – macrophages (RAW 264.7 cells), although to a lesser extent than their own metabolites (Rimbach et al. 2003). When lower concentrations of daidzein and genistein were tested, results failed to demonstrate a scavenging activity towards ROS (Guo et al. 2002). Therefore, it has been proposed that their antioxidant properties at this physiological concentration might be attributed to their capacity of enhancing other antioxidant enzymes. Guo et al. (2002) have demonstrated a biphasic effect of some phytoestrogens. Daidzein at a concentration of 0.005 - 5 μ M and genistein (0.005 μ M) increased cellular levels of GSH, while higher concentrations (50 μ M) lead to a considerable depletion in intracellular GSH in human umbilical cord vein endothelial cell line. As it was previously explained, nicotine reduces the levels of GSH (Chang et al. 2002, Chang et al. 2003, Cigremis et al. 2004), so that, an appropriate

concentration of phytoestrogens would be capable of counteracting this action, preventing the damaging effects of nicotine in periodontal tissues. In our study, we have shown that phytoestrogens were capable of reversing the negative effects exerted by nicotine in cultured human osteoblasts and periosteal fibroblasts in 5 α -reductase activity, increasing the amounts of DHT yields produced by both types of cells over control values. This corroborates previous results where phytoestrogens have been demonstrated to act as antioxidants with cells affected by oxidative stress (Rimbach et al. 2003).

Phytoestrogens also have the ability to bind to estrogen receptors (ERs) thanks to their structural similarity with the molecule of estrogen (Dijsselbloem et al. 2004, Magee & Rowland 2004, Suh et al. 2003). This confers on them the possibility of having estrogenic properties, without experiencing the side effects that characterize estrogen (increase in breast cancer) (Suh et al. 2003).

Estrogen, and as a consequence phytoestrogens, have been shown to have an important role in bone formation (Bord et al. 2001, Chen et al. 2002, Suh et al. 2003). *In vitro* studies reported that 17 β -estradiol was capable of increasing osteoprotegerin activity, receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANK-L) and ER in bone-cultured cells (Bord et al. 2003). These properties were observed also in daidzein and genistein, as they were capable of diminishing interleukin-6 (IL-6) production (Chen et al. 2002), stimulating alkaline phosphatase activity (a marker of early differentiation stage) (De Wilde et al. 2004, Jia et al. 2003, Yamaguchi & Gao 1998) and osteocalcin (De Wilde et al. 2004, Jia et al. 2003) (a marker of late differentiation stage), increasing osteoprotegerin gene expression (Chen et al. 2002, De Wilde et al. 2004) and membrane levels of RANK-L (De Wilde et al. 2004). These actions are mediated through binding to estrogen receptors (ERs), found in target tissues. Although, estradiol activated ER- α more efficiently in bone cells, daidzein seemed to preferentially bind to ER- β (De Wilde et al. 2004). 6-carboxymethyl biochanin A (0.3-3000nM), a carboxyderivative of biochanin A, has been proved to increase estrogen receptor- α (ER- α) and decrease ER- β in human female osteoblasts. This is accompanied by stimulation in creatine kinase activity and in cytosolic free calcium concentration (Somjen et al. 2005). We have here tested the effects of phytoestrogens in human osteoblasts from the MG63 cell line, where the presence of ERs has previously been demonstrated (Cao et al. 2003).

3. DHT, 4A and diols

It is also interesting to note that although DHT yields seemed to follow a trend with each type of testing agent (increased with antioxidant and decreased with oxidants), the levels of 4-androstenedione (4A) and diols were not as consistent.

Testosterone is mainly converted into DHT and diols through 5α -reductase activity. But it can also be transformed into 4A via the action of 17β -hydroxysteroid dehydrogenase activity (17β -HSD). This is a reversible reaction, where 4A can also be converted into testosterone via the same enzyme (17β -HSD) (Figure 40).

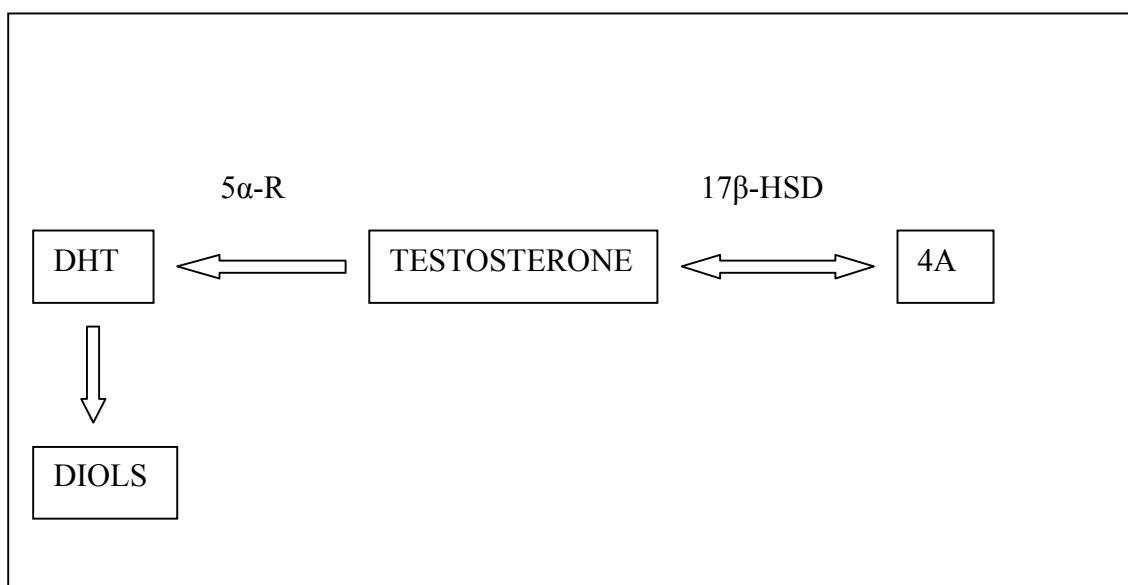


Figure 40: Metabolism of testosterone.

We expected that stimulation in DHT synthesis would result in a depletion of 4A and an increase in diols yields, due to the reaction catalysed by the 17β -HSD towards testosterone and DHT direction. However, these results were only obtained after incubation of human osteoblasts with CoQ, Pycnogenol® and nicotine. In all the other set of experiments there was not a clear tendency in 4A and diols yields. This could be explained because the concentrations employed are sufficiently high to show a stimulatory response in DHT synthesis but not strong enough for seeing a change in 4A or diols levels.

Soory & Suchak, 2003, observed a decrease in 4A and diols yields in oral periosteal fibroblasts after incubation with serial concentration of nicotine (30-100µg/ml). This could be attributed to an inhibition 17β -HSD activity. We were not able to confirm this activity, as we have not obtained a clear pattern in the production of 4A and diols (Soory & Suchak 2003).

4. Comparison of both types of cells

Two different cell types have been used in this study: human periosteal fibroblasts, obtained from patients undergoing periodontal surgery, and human osteoblasts from an osteosarcoma cell line (MG63). As a general trend we observed that fibroblasts were able to produce higher levels of DHT than osteoblasts, even in non-stimulated cases (control). However, osteoblasts were more influenced by the addition of antioxidants / oxidants, as proved by their capacity to induce greater changes in DHT yields (increases or decreases).

In the case of phytoestrogens, this heterogeneity could be attributed to their estrogenic properties. In bone cell cultures, estrogen receptors have a different pattern of expression depending on the osteoblast developmental stage (Wiren et al. 2002). During early phases, the levels of ER- α and ER- β are both elevated, with a decrease in ER- α in postmineralizing cultures (Wiren et al. 2002). Osteoblasts from the cell line MG63 are mature cells, where expression of ER- β has been proved (Cao et al. 2003). Phytoestrogens preferentially bind to the ER- β isoform (Dijsselbloem et al. 2004, Magee & Rowland 2004); therefore, they would be able to exert their effects through binding to this estrogen receptor. The fact that the ER- β expression is increased in this type of cells would allow a greater action of phytoestrogens in terms of reducing oxidative stress.

Pycnogenol® is formed by a mixture of different compounds. Among them, flavonoids can be mainly found (Kimbrough et al. 2002, Ni et al. 2002, Packer et al. 1999). Flavonoids belong to the group of phytoestrogens (Dang & Lowik 2005, Dijsselbloem et al. 2004, Whitehead & Lacey 2003), and therefore, they could also bind to ER- β , and induce greater changes in testosterone metabolism.

Periosteal fibroblasts can be seen as multi-potential cells, with the ability to differentiate into mature stabilized cells. By contrast with osteoblasts, they were obtained from patients during periodontal therapy. Fibroblasts between the fourth and ninth passage were used. The expression of estrogen receptors has not yet been studied in periosteal fibroblasts. Their decreased capacity to be affected by the addition of oxidants / antioxidants in the culture medium (smaller changes in DHT levels when compared with control incubations) might be attributed to a reduced expression of ER- β .

Fibroblasts produced a higher yield at baseline, although the response to agents was more obvious in osteoblasts.

5. Clinical application in periodontal therapy

The effects of CoQ, Pycnogenol® and phytoestrogens in matrix stimulations of steroid synthesis by human oral cells have not been previously assayed by any other author. This is the first study showing that these agents play an important role in the metabolism of androgens in two types of human cells, periosteal fibroblasts and osteoblasts. The incubation of both types of cells with these agents resulted in an increase in DHT levels, induced by enhanced 5 α -reductase activity.

Furthermore, they are also capable of neutralising the detrimental effects associated with nicotine and glucose. Nicotine has already been shown to be an oxidant (Argentin & Cicchetti 2004, Crowley-Weber et al. 2003, van der Vaart et al. 2004, Yildiz et al 1998) and was responsible for a decrease in DHT yields. The recovery in DHT levels observed with the combination of nicotine with each of the testing agents might be explained by a decrease in the oxidative stress induced by nicotine.

Sometimes antioxidants need an oxidative challenge to exert their effect. This was the case of CoQ incubated with periosteal fibroblasts. The combination of CoQ with nicotine induced higher amounts of DHT than CoQ alone, compared to control values. This would imply that the effect of an antioxidant in response to an oxidative challenge (nicotine) may be higher than that from the oxidant alone.

These data might serve as a base for future clinical trials, in which these agents might be employed for the treatment of periodontal patients. The negative effect of tobacco in periodontal tissues could be counteracted by the use of antioxidants as adjunctive therapy. The way in which they should be formulated is a matter of interesting research. In the oral cavity, everything directly applied to the oral mucosa would be removed by the action of saliva. Therefore, a specific device should be designed in order to obtain a continuous release of the required substance. The locally delivered methods would be the solution to this problem.

Chapter VI.

CONCLUSIONS

1. Nicotine significantly inhibits 5 α -reductase activity, resulting in a decrease in DHT yields in cultured human periosteal fibroblasts and osteoblasts.
2. CoQ, Pycnogenol® and Phytoestrogens are capable of increasing the levels of DHT in cultured human periosteal fibroblasts and osteoblasts, confirming their role as antioxidants.
3. The combination of nicotine with CoQ, Pycnogenol® or phytoestrogens resulted in a neutralisation of the effects of nicotine in testosterone metabolism in cultured human periosteal fibroblasts and MG63 osteoblasts.
4. Cultured human osteoblasts show greater changes in testosterone metabolism than cultured human periosteal fibroblasts when incubated with nicotine, CoQ, Pycnogenol® and phytoestrogens.
5. Future research is needed within this field.

Chapter VII.

REFERENCES

- Agarwal, A., Gupta, S. & Sharma, R.K. (2005) Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 3, 28.
- Alleva, R., Tomasetti, M., Battino, M., Curatola, G., Littarru, G.P. & Folkers, K. (1995) The roles of coenzyme Q10 and vitamin E on the peroxidation of human low density lipoprotein subfractions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9388-9391.
- Altman, D. (1999) *Practical statistics for medical research*. Chapman & Hall/CRC. London.
- Argentin, G. & Cicchetti, R. (2004) Genotoxic and antiapoptotic effect of nicotine on human gingival fibroblasts. *Toxicol Sci* 79, 75-81.
- Arnal, J.F., Clamens, S., Pechet, C., Negre-Salvayre, A., Allera, C., Girolami, J.P., Salvayre, R. & Bayard, F. (1996) Ethinylestradiol does not enhance the expression of nitric oxide synthase in bovine endothelial cells but increases the release of bioactive nitric oxide by inhibiting superoxide anion production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4108-4113.
- Asdell, S.A., Doornenbal, H., Joshi, S.R. & Sperling, G.A. (1967) The effects of sex steroid hormones upon longevity in rats. *J Reprod Fertil* 14, 113-120.
- Bai, X.C., Lu, D., Bai, J., Zheng, H., Ke, Z.Y., Li, X.M. & Luo, S.Q. (2004) Oxidative stress inhibits osteoblastic differentiation of bone cells by ERK and NF-kappaB. *Biochem Biophys Res Commun* 314, 197-207.
- Barnes, S., Grubbs, C., Setchell, K.D. & Carlson, J. (1990) Soybeans inhibit mammary tumors in models of breast cancer. *Prog Clin Biol Res* 347, 239-253.
- Battino, M., Ferreiro, M.S., Armeni, T., Politi, A., Bompadre, S., Massoli, A. & Bullon, P. (2005) In vitro antioxidant activities of antioxidant-enriched toothpastes. *Free Radic Res* 39, 343-350.
- Battino, M., Ferreiro, M.S., Quiles, J.L., Bompadre, S., Leone, L. & Bullon, P. (2003) Alterations in the oxidation products, antioxidant markers, antioxidant capacity and lipid patterns in plasma of patients affected by Papillon-Lefevre syndrome. *Free Radic Res* 37, 603-609.
- Bergstrom, J. (2004) Tobacco smoking and chronic destructive periodontal disease. *Odontology* 92, 1-8.
- Bito, T., Roy, S., Sen, C.K. & Packer, L. (2000) Pine bark extract pycnogenol downregulates IFN-gamma-induced adhesion of T cells to human keratinocytes by inhibiting inducible ICAM-1 expression. *Free Radic Biol Med* 28, 219-227.

- Blazso, G., Gabor, M. & Rohdewald, P. (1997) Antiinflammatory activities of procyanidin-containing extracts from *Pinus pinaster* Ait. after oral and cutaneous application. *Pharmazie* 52, 380-382.
- Blazso, G., Gabor, M., Schonlau, F. & Rohdewald, P. (2004) Pycnogenol accelerates wound healing and reduces scar formation. *Phytother Res* 18, 579-581.
- Bord, S., Beavan, S., Ireland, D., Horner, A. & Compston, J.E. (2001) Mechanisms by which high-dose estrogen therapy produces anabolic skeletal effects in postmenopausal women: role of locally produced growth factors. *Bone* 29, 216-222.
- Bord, S., Ireland, D.C., Beavan, S.R. & Compston, J.E. (2003) The effects of estrogen on osteoprotegerin, RANKL, and estrogen receptor expression in human osteoblasts. *Bone* 32, 136-141.
- Borras, C., Sastre, J., Garcia-Sala, D., Lloret, A., Pallardo, F.V. & Vina, J. (2003) Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radic Biol Med* 34, 546-552.
- Bostrom, L., Bergstrom, J., Dahlen, G. & Linder, L.E. (2001) Smoking and subgingival microflora in periodontal disease. *J Clin Periodontol* 28, 212-219.
- Bruch, H.R., Wolf, L., Budde, R., Romalo, G. & Schweikert, H.U. (1992) Androstenedione metabolism in cultured human osteoblast-like cells. *J Clin Endocrinol Metab* 75, 101-105.
- Cao, L., Bu, R., Oakley, J.I., Kalla, S.E. & Blair, H.C. (2003) Estrogen receptor-beta modulates synthesis of bone matrix proteins in human osteoblast-like MG63 cells. *J Cell Biochem* 89, 152-164.
- Ceriello, A. & Motz, E. (2004) Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 816-823.
- Chang, Y.C., Hsieh, Y.S., Lii, C.K., Huang, F.M., Tai, K.W. & Chou, M.Y. (2003) Induction of c-fos expression by nicotine in human periodontal ligament fibroblasts is related to cellular thiol levels. *J Periodontal Res* 38, 44-50.
- Chang, Y.C., Huang, F.M., Tai, K.W., Yang, L.C. & Chou, M.Y. (2002) Mechanisms of cytotoxicity of nicotine in human periodontal ligament fibroblast cultures in vitro. *J Periodontal Res* 37, 279-285.
- Chen, X.W., Garner, S.C. & Anderson, J.J. (2002) Isoflavones regulate interleukin-6 and osteoprotegerin synthesis during osteoblast cell differentiation via an

- estrogen-receptor-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 295, 417-422.
- Chew, G.T. & Watts, G.F. (2004) Coenzyme Q10 and diabetic endotheliopathy: oxidative stress and the 'recoupling hypothesis'. *Qjm* 97, 537-548.
- Chiang, K., Parthasarathy, S. & Santanam, N. (2004) Estrogen, neutrophils and oxidation. *Life Sci* 75, 2425-2438.
- Cho, K.J., Yun, C.H., Packer, L. & Chung, A.S. (2001) Inhibition mechanisms of bioflavonoids extracted from the bark of *Pinus maritima* on the expression of proinflammatory cytokines. *Ann N Y Acad Sci* 928, 141-156.
- Cigremis, Y., Turkoz, Y., Akgoz, M. & Sozmen, M. (2004) The effects of chronic exposure to ethanol and cigarette smoke on the level of reduced glutathione and malondialdehyde in rat kidney. *Urol Res* 32, 213-218.
- Colvard, D., Spelsberg, T., Eriksen, E., Keeting, P. & Riggs, B.L. (1989) Evidence of steroid receptors in human osteoblast-like cells. *Connect Tissue Res* 20, 33-40.
- Coxam, V., Bowman, B.M., Mechem, M., Roth, C.M., Miller, M.A. & Miller, S.C. (1996) Effects of dihydrotestosterone alone and combined with estrogen on bone mineral density, bone growth, and formation rates in ovariectomized rats. *Bone* 19, 107-114.
- Crowley-Weber, C.L., Dvorakova, K., Crowley, C., Bernstein, H., Bernstein, C., Garewal, H. & Payne, C.M. (2003) Nicotine increases oxidative stress, activates NF-kappaB and GRP78, induces apoptosis and sensitizes cells to genotoxic/xenobiotic stresses by a multiple stress inducer, deoxycholate: relevance to colon carcinogenesis. *Chem Biol Interact* 145, 53-66.
- Dang, Z.C. & Lowik, C. (2005) Dose-dependent effects of phytoestrogens on bone. *Trends Endocrinol Metab* 16, 207-213.
- Dantas, A.P., Tostes, R.C., Fortes, Z.B., Costa, S.G., Nigro, D. & Carvalho, M.H. (2002) In vivo evidence for antioxidant potential of estrogen in microvessels of female spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 39, 405-411.
- Davey, R.A., Hahn, C.N., May, B.K. & Morris, H.A. (2000) Osteoblast gene expression in rat long bones: effects of ovariectomy and dihydrotestosterone on mRNA levels. *Calcif Tissue Int* 67, 75-79.
- De Wilde, A., Lieberherr, M., Colin, C. & Pointillart, A. (2004) A low dose of daidzein acts as an ERbeta-selective agonist in trabecular osteoblasts of young female piglets. *J Cell Physiol* 200, 253-262.

- Dijsselbloem, N., Vanden Berghe, W., De Naeyer, A. & Haegeman, G. (2004) Soy isoflavone phyto-pharmaceuticals in interleukin-6 affections. Multi-purpose nutraceuticals at the crossroad of hormone replacement, anti-cancer and anti-inflammatory therapy. *Biochem Pharmacol* 68, 1171-1185.
- Droge, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82, 47-95.
- Dubey, R.K., Tyurina, Y.Y., Tyurin, V.A., Gillespie, D.G., Branch, R.A., Jackson, E.K. & Kagan, V.E. (1999) Estrogen and tamoxifen metabolites protect smooth muscle cell membrane phospholipids against peroxidation and inhibit cell growth. *Circ Res* 84, 229-239.
- Dubey, R.K., Rosselli, M., Imthurn, B., Keller, P.J. & Jackson, E.K. (2000) Vascular effects of environmental oestrogens: implications for reproductive and vascular health. *Hum Reprod Update* 6, 351-363.
- Duncan, A.M., Phipps, W.R. & Kurzer, M.S. (2003) Phyto-oestrogens. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 17, 253-271.
- Eriksen, E.F., Colvard, D.S., Berg, N.J., Graham, M.L., Mann, K.G., Spelsberg, T.C. & Riggs, B.L. (1988) Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science* 241, 84-86.
- Fernández-Ballesteros, R., Díez-Nicolas, J. & Ruiz-Torres, A. (1999) In: Schroot J, Fernández-Ballesteros R, Rudinger G eds. *Aging in Europe*. Amsterdam: IOS Press; 1999:107-21.
- Gao, Y., Qian, W.P., Dark, K., Toraldo, G., Lin, A.S., Guldberg, R.E., Flavell, R.A., Weitzmann, M.N. & Pacifici, R. (2004) Estrogen prevents bone loss through transforming growth factor beta signaling in T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16618-16623.
- Giannopoulou, C., Roehrich, N. & Mombelli, A. (2001) Effect of nicotine-treated epithelial cells on the proliferation and collagen production of gingival fibroblasts. *J Clin Periodontol* 28, 769-775.
- Gordon, C.M., LeBoff, M.S. & Glowacki, J. (2001) Adrenal and gonadal steroids inhibit IL-6 secretion by human marrow cells. *Cytokine* 16, 178-186.
- Green, K., Brand, M.D. & Murphy, M.P. (2004) Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes* 53 Suppl 1, S110-118.

- Grimm, T., Schafer, A. & Hogger, P. (2004) Antioxidant activity and inhibition of matrix metalloproteinases by metabolites of maritime pine bark extract (pycnogenol). *Free Radic Biol Med* 36, 811-822.
- Gullihorn, L., Karpman, R. & Lippiello, L. (2005) Differential effects of nicotine and smoke condensate on bone cell metabolic activity. *J Orthop Trauma* 19, 17-22.
- Guo, Q., Rimbach, G., Moini, H., Weber, S. & Packer, L. (2002) ESR and cell culture studies on free radical-scavenging and antioxidant activities of isoflavonoids. *Toxicology* 179, 171-180.
- Hagfors, L., Leanderson, P., Skoldstam, L., Andersson, J. & Johansson, G. (2003) Antioxidant intake, plasma antioxidants and oxidative stress in a randomized, controlled, parallel, Mediterranean dietary intervention study on patients with rheumatoid arthritis. *Nutr J* 2, 5.
- Halliwell, B. & Grootveld, M. (1987) The measurement of free radical reactions in humans. Some thoughts for future experimentation. *FEBS Lett* 213, 9-14.
- Hanioka, T., Tanaka, M., Ojima, M., Shizukuishi, S. & Folkers, K. (1994) Effect of topical application of coenzyme Q10 on adult periodontitis. *Mol Aspects Med* 15 Suppl, s241-248.
- Hannigan, E., O'Connell, D.P., Hannigan, A. & Buckley, L.A. (2004) Soluble cell adhesion molecules in gingival crevicular fluid in periodontal health and disease. *J Periodontol* 75, 546-550.
- Issa, S., Schnabel, D., Feix, M., Wolf, L., Schaefer, H.E., Russell, D.W. & Schweikert, H.U. (2002) Human osteoblast-like cells express predominantly steroid 5 α -reductase type 1. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 5401-5407.
- Itagaki, T., Shimizu, I., Cheng, X., Yuan, Y., Oshio, A., Tamaki, K., Fukuno, H., Honda, H., Okamura, Y. & Ito, S. (2005) Opposing effects of oestradiol and progesterone on intracellular pathways and activation processes in the oxidative stress induced activation of cultured rat hepatic stellate cells. *Gut* 54, 1782-1789.
- Ito, I., Hayashi, T., Yamada, K., Kuzuya, M., Naito, M. & Iguchi, A. (1995) Physiological concentration of estradiol inhibits polymorphonuclear leukocyte chemotaxis via a receptor mediated system. *Life Sci* 56, 2247-2253.
- Jain, S.K., Rogier, K., Prouty, L. & Jain, S.K. (2004) Protective effects of 17 β -estradiol and trivalent chromium on interleukin-6 secretion, oxidative stress, and adhesion of monocytes: relevance to heart disease in postmenopausal women. *Free Radic Biol Med* 37, 1730-1735.

- James, J.A., Sayers, N.M., Drucker, D.B. & Hull, P.S. (1999) Effects of tobacco products on the attachment and growth of periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol* 70, 518-525.
- Jaswal, S., Mehta, H.C., Sood, A.K. & Kaur, J. (2003) Antioxidant status in rheumatoid arthritis and role of antioxidant therapy. *Clin Chim Acta* 338, 123-129.
- Jia, T.L., Wang, H.Z., Xie, L.P., Wang, X.Y. & Zhang, R.Q. (2003) Daidzein enhances osteoblast growth that may be mediated by increased bone morphogenetic protein (BMP) production. *Biochem Pharmacol* 65, 709-715.
- Johnson, G.K. & Hill, M. (2004) Cigarette smoking and the periodontal patient. *J Periodontol* 75, 196-209.
- Josefsson, E., Tarkowski, A. & Carlsten, H. (1992) Anti-inflammatory properties of estrogen. I. In vivo suppression of leukocyte production in bone marrow and redistribution of peripheral blood neutrophils. *Cell Immunol* 142, 67-78.
- Kamanga-Sollo, E., Pampusch, M.S., Xi, G., White, M.E., Hathaway, M.R. & Dayton, W.R. (2004) IGF-I mRNA levels in bovine satellite cell cultures: effects of fusion and anabolic steroid treatment. *J Cell Physiol* 201, 181-189.
- Kanno, S., Hirano, S. & Kayama, F. (2004) Effects of phytoestrogens and environmental estrogens on osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. *Toxicology* 196, 137-145.
- Kasperk, C.H., Wergedal, J.E., Farley, J.R., Linkhart, T.A., Turner, R.T. & Baylink, D.J. (1989) Androgens directly stimulate proliferation of bone cells in vitro. *Endocrinology* 124, 1576-1578.
- Katz, J., Caudle, R.M., Bhattacharyya, I., Stewart, C.M. & Cohen, D.M. (2005) Receptor for advanced glycation end product (RAGE) upregulation in human gingival fibroblasts incubated with normicotine. *J Periodontol* 76, 1171-1174.
- Kim, Y.D., Chen, B., Beauregard, J., Kouretas, P., Thomas, G., Farhat, M.Y., Myers, A.K. & Lees, D.E. (1996) 17 beta-Estradiol prevents dysfunction of canine coronary endothelium and myocardium and reperfusion arrhythmias after brief ischemia/reperfusion. *Circulation* 94, 2901-2908.
- Kim, Y.G. & Park, H.Y. (2004) The effects of Pycnogenol on DNA damage in vitro and expression of superoxide dismutase and HP1 in *Escherichia coli* SOD and catalase deficient mutant cells. *Phytother Res* 18, 900-905.

- Kimbrough, C., Chun, M., dela Roca, G. & Lau, B.H. (2002) PYCNOGENOL chewing gum minimizes gingival bleeding and plaque formation. *Phytomedicine* 9, 410-413.
- Koga, M., Hirano, K., Hirano, M., Nishimura, J., Nakano, H. & Kanaide, H. (2004) Akt plays a central role in the anti-apoptotic effect of estrogen in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 324, 321-325.
- Komm, B.S., Terpening, C.M., Benz, D.J., Graeme, K.A., Gallegos, A., Korc, M., Greene, G.L., O'Malley, B.W. & Haussler, M.R. (1988) Estrogen binding, receptor mRNA, and biologic response in osteoblast-like osteosarcoma cells. *Science* 241, 81-84.
- Lee, C.F., Liu, C.Y., Chen, S.M., Sikorska, M., Lin, C.Y., Chen, T.L. & Wei, Y.H. (2005) Attenuation of UV-induced apoptosis by coenzyme Q10 in human cells harboring large-scale deletion of mitochondrial DNA. *Ann N Y Acad Sci* 1042, 429-438.
- Lieberherr, M., Cournot, G. & Robins, S.P. (2003) Guidelines for using in vitro methods to study the effects of phyto-oestrogens on bone. *Br J Nutr* 89 Suppl 1, S59-73.
- Liegibel, U.M., Sommer, U., Tomakidi, P., Hilscher, U., Van Den Heuvel, L., Pirzer, R., Hillmeier, J., Nawroth, P. & Kasperk, C. (2002) Concerted action of androgens and mechanical strain shifts bone metabolism from high turnover into an osteoanabolic mode. *J Exp Med* 196, 1387-1392.
- Littarru, G.P., Nakamura, R., Ho, L., Folkers, K. & Kuzell, W.C. (1971) Deficiency of coenzyme Q 10 in gingival tissue from patients with periodontal disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 2332-2335.
- Liu, X., Zhou, H.J. & Rohdewald, P. (2004) French maritime pine bark extract Pycnogenol dose-dependently lowers glucose in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 27, 839.
- Lunn, R., Rawlinson, A., Walsh, T. & Hodges, S. (1997) Coenzyme Q10 is lower in gingival crevicular fluid in periodontitis; Conference paper. Meeting of Society of Nordic Odontology; P 1-6.
- Magee, P.J. & Rowland, I.R. (2004) Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer. *Br J Nutr* 91, 513-531.
- Mascarenhas, P., Gapski, R., Al-Shammari, K. & Wang, H.L. (2003) Influence of sex hormones on the periodontium. *J Clin Periodontol* 30, 671-681.

- Mason, R.A. & Morris, H.A. (1997) Effects of dihydrotestosterone on bone biochemical markers in sham and oophorectomized rats. *J Bone Miner Res* 12, 1431-1437.
- McCarthy, A.D., Etcheverry, S.B., Bruzzone, L., Lettieri, G., Barrio, D.A. & Cortizo, A.M. (2001) Non-enzymatic glycosylation of a type I collagen matrix: effects on osteoblastic development and oxidative stress. *BMC Cell Biol* 2, 16.
- Mody, N., Parhami, F., Sarafian, T.A. & Demer, L.L. (2001) Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. *Free Radic Biol Med* 31, 509-519.
- Moor, A.N., Gottipati, S., Mallet, R.T., Sun, J., Giblin, F.J., Roque, R. & Cammarata, P.R. (2004) A putative mitochondrial mechanism for antioxidative cytoprotection by 17beta-estradiol. *Exp Eye Res* 78, 933-944.
- Morito, K., Aomori, T., Hirose, T., Kinjo, J., Hasegawa, J., Ogawa, S., Inoue, S., Muramatsu, M. & Masamune, Y. (2002) Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta (II). *Biol Pharm Bull* 25, 48-52.
- Nakamura, R., Littarru, G.P., Folkers, K. & Wilkinson, E.G. (1973) Deficiency of coenzyme Q in gingiva of patients with periodontal disease. *Int J Vitam Nutr Res* 43, 84-92.
- Nakamura, R., Littarru, G.P., Folkers, K. & Wilkinson, E.G. (1974) Study of CoQ10-enzymes in gingiva from patients with periodontal disease and evidence for a deficiency of coenzyme Q10. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 1456-1460.
- Ni, Z., Mu, Y. & Gulati, O. (2002) Treatment of melasma with Pycnogenol. *Phytother Res* 16, 567-571.
- Normington, K. & Russell, D.W. (1992) Tissue distribution and kinetic characteristics of rat steroid 5 alpha-reductase isozymes. Evidence for distinct physiological functions. *J Biol Chem* 267, 19548-19554.
- Nylander, M., Weiner, J. & Norlund, M. (1996) A double blind clinical dose-response study on effects of CoQ10 on gingival bleeding / periodontal disease. 7th International Symp on Trends in Biomedicine in Finland. Suppl 8. 1-7.
- O'Brien, N.M., Woods, J.A., Aherne, S.A. & O'Callaghan, Y.C. (2000) Cytotoxicity, genotoxicity and oxidative reactions in cell-culture models: modulatory effects of phytochemicals. *Biochem Soc Trans* 28, 22-26.
- Oh, H.Y., Kim, S.S., Chung, H.Y. & Yoon, S. (2005) Isoflavone supplements exert hormonal and antioxidant effects in postmenopausal Korean women with diabetic retinopathy. *J Med Food* 8, 1-7.

- Ojanotko, A., Nienstedt, W. & Harri, M.P. (1980) Metabolism of testosterone by human healthy and inflamed gingiva in vitro. *Arch Oral Biol* 25, 481-484.
- Okazaki, R., Inoue, D., Shibata, M., Saika, M., Kido, S., Ooka, H., Tomiyama, H., Sakamoto, Y. & Matsumoto, T. (2002) Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell lines that express estrogen receptor (ER) alpha or beta. *Endocrinology* 143, 2349-2356.
- Packer, L., Rimbach, G. & Virgili, F. (1999) Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, pycnogenol. *Free Radic Biol Med* 27, 704-724.
- Papucci, L., Schiavone, N., Witort, E., Donnini, M., Lapucci, A., Tempestini, A., Formigli, L., Zecchi-Orlandini, S., Orlandini, G., Carella, G., Brancato, R. & Capaccioli, S. (2003) Coenzyme q10 prevents apoptosis by inhibiting mitochondrial depolarization independently of its free radical scavenging property. *J Biol Chem* 278, 28220-28228.
- Parkar, M.H., Newman, H.N. & Olsen, I. (1996) Polymerase chain reaction analysis of oestrogen and androgen receptor expression in human gingival and periodontal tissue. *Arch Oral Biol* 41, 979-983.
- Peacock, M.E., Sutherland, D.E., Schuster, G.S., Brennan, W.A., O'Neal, R.B., Strong, S.L. & Van Dyke, T.E. (1993) The effect of nicotine on reproduction and attachment of human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol* 64, 658-665.
- Pereira, C.M. & Oliveira, C.R. (1997) Glutamate toxicity on a PC12 cell line involves glutathione (GSH) depletion and oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 23, 637-647.
- Pool-Zobel, B.L., Adlercreutz, H., Glei, M., Liegibel, U.M., Sittlington, J., Rowland, I., Wahala, K. & Rechkemmer, G. (2000) Isoflavonoids and lignans have different potentials to modulate oxidative genetic damage in human colon cells. *Carcinogenesis* 21, 1247-1252.
- Preber, H., Bergstrom, J. & Linder, L.E. (1992) Occurrence of periopathogens in smoker and non-smoker patients. *J Clin Periodontol* 19, 667-671.
- Rahman, Z.A. & Soory, M. (2006) Antioxidant effects of glutathione and IGF in a hyperglycaemic cell culture model of fibroblasts: some actions of advanced glycaemic end products (AGE) and nicotine. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 6, 279-286.

- Ramos, V.A., Ramos, P.A. & Dominguez, M.C. (2000) [Role of oxidative stress in the maintenance of inflammation in patients with juvenile rheumatoid arthritis]. *J Pediatr (Rio J)* 76, 125-132.
- Reinhardt, R.A., Payne, J.B., Maze, C.A., Patil, K.D., Gallagher, S.J. & Mattson, J.S. (1999) Influence of estrogen and osteopenia/osteoporosis on clinical periodontitis in postmenopausal women. *J Periodontol* 70, 823-828.
- Rimbach, G., De Pascual-Teresa, S., Ewins, B.A., Matsugo, S., Uchida, Y., Minihane, A.M., Turner, R., Vafeiadou, K. & Weinberg, P.D. (2003) Antioxidant and free radical scavenging activity of isoflavone metabolites. *Xenobiotica* 33, 913-925.
- Rivera-Hidalgo, F. (2003) Smoking and periodontal disease. *Periodontol 2000* 32, 50-58.
- Robertson, R.P. (2004) Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J Biol Chem* 279, 42351-42354.
- Rohdewald, P. (2002) A review of the French maritime pine bark extract (Pycnogenol), a herbal medication with a diverse clinical pharmacology. *Int J Clin Pharmacol Ther* 40, 158-168.
- Rong, Y., Li, L., Shah, V. & Lau, B.H. (1994) Pycnogenol protects vascular endothelial cells from t-butyl hydroperoxide induced oxidant injury. *Biotechnol Ther* 5, 117-126.
- Saliou, C., Rimbach, G., Moini, H., McLaughlin, L., Hosseini, S., Lee, J., Watson, R.R. & Packer, L. (2001) Solar ultraviolet-induced erythema in human skin and nuclear factor-kappa-B-dependent gene expression in keratinocytes are modulated by a French maritime pine bark extract. *Free Radic Biol Med* 30, 154-160.
- Schett, G., Tohidast-Akrad, M., Steiner, G. & Smolen, J. (2001) The stressed synovium. *Arthritis Res* 3, 80-86.
- Schmitt-Schillig, S., Schaffer, S., Weber, C.C., Eckert, G.P. & Muller, W.E. (2005) Flavonoids and the aging brain. *J Physiol Pharmacol* 56 Suppl 1, 23-36.
- Schweikert, H.U., Rulf, W., Niederle, N., Schafer, H.E., Keck, E. & Kruck, F. (1980) Testosterone metabolism in human bone. *Acta Endocrinol (Copenh)* 95, 258-264.
- Scott, J.A. & King, G.L. (2004) Oxidative stress and antioxidant treatment in diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 1031, 204-213.

- Sculley, D.V. & Langley-Evans, S.C. (2003) Periodontal disease is associated with lower antioxidant capacity in whole saliva and evidence of increased protein oxidation. *Clin Sci (Lond)* 105, 167-172.
- Sen, C.K., Khanna, S., Gordillo, G., Bagchi, D., Bagchi, M. & Roy, S. (2002) Oxygen, oxidants, and antioxidants in wound healing: an emerging paradigm. *Ann N Y Acad Sci* 957, 239-249.
- Siler-Marsiglio, K.I., Paiva, M., Madorsky, I., Serrano, Y., Neeley, A. & Heaton, M.B. (2004) Protective mechanisms of pycnogenol in ethanol-insulted cerebellar granule cells. *J Neurobiol* 61, 267-276.
- Sime, S. & Reeve, V.E. (2004) Protection from inflammation, immunosuppression and carcinogenesis induced by UV radiation in mice by topical Pycnogenol. *Photochem Photobiol* 79, 193-198.
- Singh, U., Devaraj, S. & Jialal, I. (2005) Vitamin E, oxidative stress, and inflammation. *Annu Rev Nutr* 25, 151-174.
- Snyder, H.B., Caughman, G., Lewis, J., Billman, M.A. & Schuster, G. (2002) Nicotine modulation of in vitro human gingival fibroblast beta1 integrin expression. *J Periodontol* 73, 505-510.
- Somjen, D., Kohen, F., Lieberherr, M., Gayer, B., Schejter, E., Katzburg, S., Limor, R., Sharon, O., Knoll, E., Posner, G.H., Kaye, A.M. & Stern, N. (2005) Membranal effects of phytoestrogens and carboxy derivatives of phytoestrogens on human vascular and bone cells: new insights based on studies with carboxy-biochanin A. *J Steroid Biochem Mol Biol* 93, 293-303.
- Sooriyamoorthy, M. & Gower, D.B. (1989a) Hormonal influences on gingival tissue: relationship to periodontal disease. *J Clin Periodontol* 16, 201-208.
- Sooriyamoorthy, M. & Gower, D.B. (1989b) Phenytoin stimulation of testosterone metabolism in inflamed human gingival fibroblasts. *Biochem Soc Trans* 17, 1020-1021.
- Sooriyamoorthy, M., Gower, D.B. & Eley, B.M. (1990) Androgen metabolism in gingival hyperplasia induced by nifedipine and cyclosporin. *J Periodontal Res* 25, 25-30.
- Soory, M. (1995) Bacterial steroidogenesis by periodontal pathogens and the effect of bacterial enzymes on steroid conversions by human gingival fibroblasts in culture. *J Periodontal Res* 30, 124-131.

- Soory, M. (2002) Hormone mediation of immune responses in the progression of diabetes, rheumatoid arthritis and periodontal diseases. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2, 13-25.
- Soory, M. (2004) Biomarkers of diabetes mellitus and rheumatoid arthritis associated with oxidative stress, applicable to periodontal diseases. *Current topics in Steroid Research* 4, 1-17.
- Soory, M. & Suchak, A. (2003) Effects of alkaline phosphatase and its inhibitor levamisole on the modulation of androgen metabolism by nicotine and minocycline in human gingival and oral periosteal fibroblasts. *Arch Oral Biol* 48, 69-76.
- Soory, M. & Tilakaratne, A. (2003) Anabolic potential of fibroblasts from chronically inflamed gingivae grown in a hyperglycemic culture medium in the presence or absence of insulin and nicotine. *J Periodontol* 74, 1771-1777.
- Stoltenberg, J.L., Osborn, J.B., Pihlstrom, B.L., Herzberg, M.C., Aeppli, D.M., Wolff, L.F. & Fischer, G.E. (1993) Association between cigarette smoking, bacterial pathogens, and periodontal status. *J Periodontol* 64, 1225-1230.
- Strehlow, K., Rotter, S., Wassmann, S., Adam, O., Grohe, C., Laufs, K., Bohm, M. & Nickenig, G. (2003) Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. *Circ Res* 93, 170-177.
- Suh, K.S., Koh, G., Park, C.Y., Woo, J.T., Kim, S.W., Kim, J.W., Park, I.K. & Kim, Y.S. (2003) Soybean isoflavones inhibit tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis and the production of interleukin-6 and prostaglandin E2 in osteoblastic cells. *Phytochemistry* 63, 209-215.
- Tamir, S., Izrael, S. & Vaya, J. (2002) The effect of oxidative stress on ERalpha and ERbeta expression. *J Steroid Biochem Mol Biol* 81, 327-332.
- Taniyama, Y. & Griendling, K.K. (2003) Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* 42, 1075-1081.
- Tanko, L.B. & Christiansen, C. (2004) An update on the antiestrogenic effect of smoking: a literature review with implications for researchers and practitioners. *Menopause* 11, 104-109.
- Tanur, E., McQuade, M.J., McPherson, J.C., Al-Hashimi, I.H. & Rivera-Hidalgo, F. (2000) Effects of nicotine on the strength of attachment of gingival fibroblasts to glass and non-diseased human root surfaces. *J Periodontol* 71, 717-722.

- Tilakaratne, A. & Soory, M. (2000) Effects of the anti-androgen finasteride on 5 alpha-reduction of androgens in the presence of progesterone in human gingival fibroblasts: modulatory actions of the alkaline phosphatase inhibitor levamisole. *J Periodontal Res* 35, 179-185.
- Tsunemitsu, A. & Matsumura, T. (1967) Effect of coenzyme Q administration on hypercitricemia of patients with periodontal disease. *J Dent Res* 46, 1382-1384.
- Ueda, T., Ueda, T. & Armstrong, D. (1996) Preventive effect of natural and synthetic antioxidants on lipid peroxidation in the mammalian eye. *Ophthalmic Res* 28, 184-192.
- Umeda, M., Chen, C., Bakker, I., Contreras, A., Morrison, J.L. & Slots, J. (1998) Risk indicators for harboring periodontal pathogens. *J Periodontol* 69, 1111-1118.
- van der Vaart, H., Postma, D.S., Timens, W. & ten Hacken, N.H. (2004) Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. *Thorax* 59, 713-721.
- van Winkelhoff, A.J., Bosch-Tijhof, C.J., Winkel, E.G. & van der Reijden, W.A. (2001) Smoking affects the subgingival microflora in periodontitis. *J Periodontol* 72, 666-671.
- Vanderschueren, D., Van Herck, E., Suiker, A.M., Visser, W.J., Schot, L.P. & Bouillon, R. (1992) Bone and mineral metabolism in aged male rats: short and long term effects of androgen deficiency. *Endocrinology* 130, 2906-2916.
- Vanderschueren, D., Vandenput, L., Boonen, S., Lindberg, M.K., Bouillon, R. & Ohlsson, C. (2004) Androgens and bone. *Endocr Rev* 25, 389-425.
- Varani, J., Kelley, E.A., Perone, P. & Lateef, H. (2004) Retinoid-induced epidermal hyperplasia in human skin organ culture: inhibition with soy extract and soy isoflavones. *Exp Mol Pathol* 77, 176-183.
- Vincent, A.M., Russell, J.W., Low, P. & Feldman, E.L. (2004) Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr Rev* 25, 612-628.
- Virgili, F., Kim, D. & Packer, L. (1998a) Procyanidins extracted from pine bark protect alpha-tocopherol in ECV 304 endothelial cells challenged by activated RAW 264.7 macrophages: role of nitric oxide and peroxynitrite. *FEBS Lett* 431, 315-318.
- Virgili, F., Kobuchi, H. & Packer, L. (1998b) Procyanidins extracted from *Pinus maritima* (Pycnogenol): scavengers of free radical species and modulators of

- nitrogen monoxide metabolism in activated murine RAW 264.7 macrophages. *Free Radic Biol Med* 24, 1120-1129.
- Vittekk, J., Rappaport, S.C., Gordon, G.G., Munnangi, P.R. & Southren, A.L. (1979) Concentration of circulating hormones and metabolism of androgens by human gingiva. *J Periodontol* 50, 254-264.
- Walker, L.M., Preston, M.R., Magnay, J.L., Thomas, P.B. & El Haj, A.J. (2001) Nicotinic regulation of c-fos and osteopontin expression in human-derived osteoblast-like cells and human trabecular bone organ culture. *Bone* 28, 603-608.
- Wang, X., Simpkins, J.W., Dykens, J.A. & Cammarata, P.R. (2003) Oxidative damage to human lens epithelial cells in culture: estrogen protection of mitochondrial potential, ATP, and cell viability. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 2067-2075.
- Wang, X.L., Rainwater, D.L., Mahaney, M.C. & Stocker, R. (2004) Cosupplementation with vitamin E and coenzyme Q10 reduces circulating markers of inflammation in baboons. *Am J Clin Nutr* 80, 649-655.
- Watts, T.L. (1995) Coenzyme Q10 and periodontal treatment: is there any beneficial effect? *Br Dent J* 178, 209-213.
- Wendell, K.J. & Stein, S.H. (2001) Regulation of cytokine production in human gingival fibroblasts following treatment with nicotine and lipopolysaccharide. *J Periodontol* 72, 1038-1044.
- Whitehead, S.A., Cross, J.E., Burden, C. & Lacey, M. (2002) Acute and chronic effects of genistein, tyrphostin and lavendustin A on steroid synthesis in luteinized human granulosa cells. *Hum Reprod* 17, 589-594.
- Whitehead, S.A. & Lacey, M. (2003) Phytoestrogens inhibit aromatase but not 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) type 1 in human granulosa-luteal cells: evidence for FSH induction of 17beta-HSD. *Hum Reprod* 18, 487-494.
- Wiernsperger, N.F. (2003) Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. *Diabetes Metab* 29, 579-585.
- Winkler-Stuck, K., Wiedemann, F.R., Wallesch, C.W. & Kunz, W.S. (2004) Effect of coenzyme Q10 on the mitochondrial function of skin fibroblasts from Parkinson patients. *J Neurol Sci* 220, 41-48.
- Wiren, K.M., Chapman Evans, A. & Zhang, X.W. (2002) Osteoblast differentiation influences androgen and estrogen receptor-alpha and -beta expression. *J Endocrinol* 175, 683-694.

- Yamaguchi, M. & Gao, Y.H. (1998) Inhibitory effect of genistein on bone resorption in tissue culture. *Biochem Pharmacol* 55, 71-76.
- Yamaya, M., Sekizawa, K., Masuda, T., Morikawa, M., Sawai, T. & Sasaki, H. (1995) Oxidants affect permeability and repair of the cultured human tracheal epithelium. *Am J Physiol* 268, L284-293.
- Yildiz, D., Ercal, N. & Armstrong, D.W. (1998) Nicotine enantiomers and oxidative stress. *Toxicology* 130, 155-165.
- Zambon, J.J., Grossi, S.G., Machtei, E.E., Ho, A.W., Dunford, R. & Genco, R.J. (1996) Cigarette smoking increases the risk for subgingival infection with periodontal pathogens. *J Periodontol* 67, 1050-1054.

Chapter VIII.
APPENDIX

LEGEND

- AR: Androgen receptor.
- CoQ: Coenzyme Q₁₀
- D: diols
- DHT: 5 α -dihydrotestosterone
- DM: Diabetes mellitus
- DMSO: dimethyl sulphoxide
- ER: estrogen receptor
- HPF: Human periosteal fibroblasts
- HPLF: Human periodontal ligament fibroblasts
- IL: Interleukin
- MEM: Minimum Essential Medium
- MMP: metalloproteinase
- Nic: Nicotine
- Phyt: Phytoestrogens
- PMN: Polymorphonuclear
- Pyc: Pycnogenol.
- T: testosterone
- TLC: thin layer chromatography
- ROS: reactive oxygen species
- 4A: 4-androstenedione
- 14C-T: 14C-Testosterone
- 5 α -R: 5 α -reductase



**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA III**

ARTÍCULOS

**TESIS DOCTORAL:
ELENA FIGUERO RUIZ**

**DIRECTORES:
ANTONIO BASCONES MARTÍNEZ
ROCÍO CERERO LAPIEDRA**

MADRID, 2009

1. Figuro E, Soory M, Cerero R, Bascones A. Oxidant/antioxidant interactions of nicotine, Coenzyme Q10, Pycnogenol and phytoestrogens in oral periosteal fibroblasts and MG63 osteoblasts. *Steroids* 2006;71:1062-72.
2. Figuro-Ruiz E, Prieto-Prieto I, Bascones-Martínez A. Cambios hormonales asociados al embarazo. Afectación gingivo-periodontal. *Av Periodon Implantol* 2006;18(2):101-13.
3. Figuro E, Carrillo-de-Albornoz A, Herrera D, Bascones A. Gingival changes during pregnancy (I). Influence of hormonal variations on clinical and immunological parameters. Accepted in *Journal of Clinical Periodontology*.
4. Carrillo-de-Albornoz A, Figuro E, Herrera D, Bascones A. Gingival changes during pregnancy (II). Influence of hormonal variations on the subgingival biofilm. Accepted in *Journal of Clinical Periodontology*.



available at www.sciencedirect.com



journal homepage: www.elsevier.com/locate/steroids



Oxidant/antioxidant interactions of nicotine, Coenzyme Q10, Pycnogenol and phytoestrogens in oral periosteal fibroblasts and MG63 osteoblasts

Elena Figuero^{a,b,*}, Mena Soory^b, Rocío Cerero^a, Antonio Bascones^a

^a Department of Periodontology, Faculty of Dentistry, University Complutense of Madrid, Spain

^b Department of Periodontology, King's College London Dental Institute, King's College Dental Hospital, Denmark Hill, London, United Kingdom

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 June 2006

Received in revised form

4 September 2006

Accepted 5 September 2006

Published on line 11 October 2006

Keywords:

Coenzyme Q10

Pycnogenol

Phytoestrogens

Nicotine

Oxidative stress

ABSTRACT

Background: There is a growing awareness that oxidative stress may play a role in periodontal disease. The aim of this investigation was to evaluate potential oxidant/antioxidant interactions of nicotine with antioxidants (Coenzyme Q10 (CoQ), Pycnogenol®) and phytoestrogens in a cell culture model.

Methods: Duplicate incubations of human periosteal fibroblasts and osteoblasts were performed with ¹⁴C-testosterone as substrate, in the presence or absence of CoQ (20 µg/ml), Pycnogenol® (150 µg/ml), and phytoestrogens (10 and 40 µg/ml), alone and in combination with nicotine (250 µg/ml). At the end of a 24-h incubation period, the medium was solvent extracted and testosterone metabolites were separated by thin-layer chromatography and quantified using a radioisotope scanner.

Results: The incubations of osteoblasts and periosteal fibroblasts with CoQ, Pycnogenol® or phytoestrogens stimulated the synthesis of the physiologically active androgen DHT, while the yields of DHT were significantly reduced in response to nicotine compared to control values ($p < 0.001$ for phytoestrogens). The combination of nicotine with CoQ, Pycnogenol® or phytoestrogens increased the yields of DHT compared with incubation with nicotine alone in both cell types.

Conclusion: This investigation suggests that the catabolic effects of nicotine could be reversed by the addition of antioxidants such as CoQ or Pycnogenol® and phytoestrogens.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

There is a growing awareness that oxidative stress may play a role in various clinical conditions, such as diabetes mellitus, rheumatoid arthritis, atherosclerosis, malignant diseases and periodontal disease. In this context we have investigated potential oxidant/antioxidant interactions of nicotine with antioxidants (Coenzyme Q10, Pycnogenol®) and phytoestrogens in a cell culture model.

Periodontal diseases are chronic inflammatory conditions featured by loss of connective tissue, alveolar bone resorption and formation of periodontal pockets as a result of the complex interaction between microbial plaque biofilm on root surfaces and the host immune response [1]. Although this interaction is required for the onset of the disease, uncontrolled inflammatory episodes are known to persist even after removal of the antigenic stimulus. This results in high levels of proinflammatory cytokines and free radicals [2].

* Corresponding author.

E-mail address: efigueroiz@hotmail.com (E. Figuero).

0039-128X/\$ – see front matter © 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

doi:10.1016/j.steroids.2006.09.003

During inflammation, polymorphonuclear leucocytes play an important role as the first line of defence. These cells, via the phagocytic isoform of NADPH oxidase, can produce large amounts of superoxide anion radical (O_2^-) which is well known to be critical for defence against bacteria and other pathogens. The activation of phagocytic NADPH oxidase can be induced by bacterial products such as bacterial lipopolysaccharide, lipoproteins or cytokines such as interferon- γ , interleukine- 1β , and interleukine-8. Superoxide is rapidly converted to a membrane permeable form, hydrogen peroxide (H_2O_2), by superoxide dismutase activity or even spontaneously. Release of H_2O_2 may promote formation of other oxidants that are more stable including hypochlorous acid, chloramines, and aldehydes. The production of oxidants at the wound sites is not restricted to neutrophils alone but may be also produced by macrophages, which appear to initiate a long-term response to injured cells subsequent to the acute response. This massive production of reactive oxygen species (ROS) in an inflammatory environment is called the “oxidative burst”; and this suggests that wound sites are rich in oxidants along with their derivatives [3,4].

The concentration of oxidants in question is critically important. Although at micromolar concentrations oxidants such as hydrogen peroxide may favourably influence signal transduction processes that support healing; at millimolar concentrations hydrogen peroxide is likely to overwhelm the antioxidant defence system of the healing tissue, thereby delaying healing [3]. In an inflammatory environment hydrogen peroxide is produced by activated macrophages at an estimated rate of $(2-6) \times 10^{-14}$ mol/(h cell), and may reach a concentration of 10–100 μ M in the vicinity of these cells [4]. Oxidative stress induced tissue destruction is common to several systemic and oral inflammatory diseases including periodontal disease. The following agents with potential antioxidant capacity have a significant therapeutic role.

Coenzyme Q_{10} (CoQ), or ubiquinone, is intrinsic to human tissue including the gingiva, and is a vitamin according to the basic science of nutrition. It has a fundamental role in the electron transfer reaction of respiration and coupled oxidative phosphorylation in mitochondria [5–7]. CoQ has been reported to have beneficial effects in mopping up free radicals, improving periodontal treatment outcome measures [8–12], and lowering glucose levels in diabetic patients, respectively [13]. Antioxidant effects of CoQ on fibroblasts have been identified [14].

Pycnogenol® is a proprietary phytochemical extracted from the bark of the French maritime pine (*Pinus maritima*) from Bay of Biscay in the Landes de Gascogne in France. It is a blend of monomeric phenolic compounds (catechin, epicatechin, and taxifolin) and condensed flavonoids (procyanidins). These condensed polyphenols are formed by “bricks” of the flavan-3-ols catechin and epicatechin linked together into lengths ranging from dimers to heptamers (B1, B3, and B7). In addition, it contains phenolic acids, such as *p*-hydroxy benzoic, protocatechuic, gallic, vanillic, *p*-coumaric, caffeic, and ferulic acids; and glycosylation products (glucopyranosyl derivatives of either flavonols or phenolic acid) as minute constituents [15,16].

It is now employed as a nutritional supplement and a phytochemical remedy for various diseases [17]. An antioxidant

activity of Pycnogenol® has been demonstrated by *in vitro*, *in vivo*, and animal studies [17,18]. Blas   et al. [19,20] observed a correlation between the antioxidant activity of Pycnogenol® and the anti-inflammatory response. They demonstrated in an animal study with rats that regular topical application of Pycnogenol® (1–5%) during a 20-day period accelerates the wound healing process in skin and reduces scar formation [20]. It can also affect cell death and survival after various types of proapoptotic stimuli [21] and has a strong inhibitory effect towards the activity of metalloproteinase-1 (MMP-1), MMP-2, and MMP-9 [22]. Kimbrough et al. demonstrated a reduction in the mean gingival bleeding scores of 50% in a group of healthy patients chewing six pieces of Pycnogenol® (5 mg) daily for 14 days [16].

Phytoestrogens are plant derived, non-steroidal compounds, mainly found in “Leguminosae”, which have a unique diphenolic structure that gives them a high stability [23,24]. Based on their chemical structures they can be classified into three main groups: flavonoids, coumestans, and lignans. The group of flavonoids includes flavanones, flavones, and isoflavones [24–27]. In recent years, they have attracted much attention because of their potential beneficial role in prevention and treatment of several systemic diseases (cardiovascular diseases, osteoporosis, diabetes, obesity, etc.) [23,24,28] and because epidemiological studies have demonstrated an association between soy-bean containing diets and a decrease in the incidence in certain human cancers in Asian populations [29,30]. Phytoestrogens can exert their potential beneficial effects via both their estrogenic properties (binding to estrogen receptors) [23,25] and via an antioxidant pathway [31]. Genistein and daidzein have been shown to scavenge hydroxyl and superoxide anion radicals [31].

Environmental factors such as smoking have a detrimental effect on healing. Smokers are almost three times as likely to have severe periodontitis compared to non-smokers. In general, in studies where plaque accumulation was similar in smokers and non-smokers or was adjusted, current smokers had deeper probing depths, greater attachment loss, more bone loss, and fewer teeth [32–34]. The studies have shown a strong dose–response relationship between the amount of tobacco smoked and the severity of periodontal destruction; which further supports the role of smoking as a risk factor for periodontitis [32]. Nicotine, the major component of cigarette smoke has been shown to have damaging effects via an oxidative pathway [35–38]. The redox potential is an important factor for wound healing. Animal and *in vitro* studies report a decrease in the reduced glutathione (GSH)/oxidised glutathione (GSSG) ratio [39–42], an indicator of the vital balance between oxidants and antioxidants [37], in response to nicotine. It has been suggested that nicotine has dichotomous effects [43–46], while small concentrations of nicotine, to which light smokers are exposed, can enhance fibroblast attachment and growth, higher levels of nicotine can be damaging [47].

It has been suggested that sex hormones may have an important role in chronic inflammatory periodontal diseases. The expression of androgen receptor has been detected in a high proportion of periodontal and gingival tissue and in fibroblasts derived from the same source [48,49]. A number of studies

have shown that periodontal tissues are capable of metabolizing sex hormones resulting in the formation of biologically active metabolites [48]. Testosterone affects skeletal maturation and exerts significant effects on the homeostasis of mature bone [50]. It is converted by the enzyme steroid 5 α -reductase (5 α -R) to 5 α -dihydrotestosterone (DHT) before binding to the androgen receptor [51]. This physiologically active androgen, DHT, is implicated in stimulating matrix-forming cells [48], and there is documented evidence of its anabolic effects [52]. The rate of periosteal bone formation has been shown to be significantly elevated in response to DHT alone and in combination with estrogen [53]. LPS induced oxidative stress has been shown to impair steroidogenesis in Leydig cells [54], suggestive of a predictive role for steroid markers in an environment of oxidative stress. It is relevant that androgen hormones are optimally effective in an environment with low redox potential and that they induce antioxidant enzymes via activation of relevant genes [55]. In addition, they also appear to have direct antioxidant effects [56], making them effective markers of healing and oxidant–antioxidant interactions of relevance to this study.

We hypothesize that oxidants such as nicotine are responsible for a reduction in the levels of DHT, while antioxidants, such as CoQ, Pycnogenol® or phytoestrogens are capable of increasing the levels of DHT over control incubations. In addition, antioxidants will be able to neutralize the effects of oxidants, by means of increasing DHT yields above incubations with the oxidants alone. Therefore, the aim of this investigation is to determine the effects of nicotine, CoQ, Pycnogenol®, and phytoestrogens, alone and in combination, in the metabolism of 14C-testosterone by cultured human periosteal fibroblasts and osteoblasts. These results may be applied to future clinical trials in periodontal patients, specifically in smokers.

2. Experimental

Authentic steroids were supplied by Sigma Chemical Co. (Poole, Dorset, UK). They were dissolved and redistilled in ethanol (supplied by Merck Chemicals Ltd., Dagenham, Essex, UK) at appropriate concentrations and stored. The radioisotope 14C-testosterone (specific activity 58 μ Ci/ μ mol) was obtained from Amersham International (Amersham, Bucks, UK). The organic solvents for thin-layer chromatography (benzene and acetone), ethyl acetate for extraction of metabolites and chloroform to solubilise the dried bulk of extracts were all provided by BDH Chemicals (Merck) (Dagenham, Essex, UK). The thin-layer chromatography (TLC) plates were pre-coated silicagel kieselgel 60 (20 cm \times 20 cm) obtained from BDH Chemicals Ltd. (Merck), Dagenham, Essex, UK. The antioxidants Coenzyme Q10 and Pycnogenol® were gifted by Pharma Nord UK Ltd. The plant extract phytoestrogen was obtained from Bootes' chemists. Nicotine was provided by Sigma Chemicals Ltd., Fancy Road, Poole Dorset. Cell culture media components: Eagle's Minimum Essential Medium (MEM), with 10% foetal bovine serum (FBS), L-glutamine (200 mM), penicillin (5000 IU/ml), streptomycin (5 mg/ml), trypsin (0.25%) and cell culture plastics were all provided by Invitrogen Ltd., Scotland.

2.1. Cell cultures

Human periosteal fibroblasts were obtained from eight patients (four males and four females), aged 30–50 years, with muco-gingival/periodontal problems attending the Department of Periodontology, King's College London Dental Institute, UK. They were all non-smokers, free of medication and in good general health. Patient consent and approval from the local Ethics Committee were obtained. Periosteal tissue was isolated from patients undergoing muco-gingival advanced flap procedures and cultured until explants of periosteal fibroblasts were obtained. Fibroblasts of the fourth to ninth passage in monolayer culture were used for the experiments.

It is well documented that fibroblasts derived from inflamed tissue demonstrate a higher metabolic activity with androgen substrates at baseline compared with fibroblasts passaged from non-inflamed tissues [57,58]. In the present study samples were not categorized for sexes based on some studies which have shown that although gingival tissues from healthy males metabolized testosterone better than that of healthy females, chronically inflamed mucosa from both genders did not show any difference in testosterone metabolism [57,59]. Individual tissue samples obtained from patients were not pooled, in order to maintain their individuality.

Human osteoblasts were obtained from a permanent cell line isolated from human osteosarcoma, called MG-63 [60], gifted by the Eastman Dental Hospital, London, UK.

2.2. Experimental design

The contents of a fully confluent 25 cm² flask were divided among 24 wells of a multiwell dish in Eagle's MEM for each cell line and the cells were allowed to become fully confluent before setting up experiments. 14C-testosterone was incubated within the confluent monolayer cultures, in the presence or absence of each testing agent in order to analyse androgen metabolites in each case, compared to control values.

2.2.1. Establishing the optimal concentrations of CoQ, Pycnogenol® and phytoestrogens on the metabolic conversion of 14C-testosterone by cultured human periosteal fibroblasts (HPF)

In order to study the effects of CoQ, Pycnogenol® and phytoestrogens on HPF using 14C-testosterone as a substrate, it was necessary to establish effective concentrations responsible for the stimulation of HPF using a suitable range. This effective concentration would be used for the subsequent set of experiments.

Three 24-well plates were prepared with serial concentrations of CoQ: 5, 10, 20, 30, 50 μ g/ml; Pycnogenol®: 50, 100, 150, 200, 300 μ g/ml; phytoestrogens: 10, 20, 30, 40, 50 μ g/ml.

2.2.2. Effects of an optimal concentration of CoQ and Pycnogenol®, alone and in combination with nicotine, on the metabolism of 14C-T by cultured human periosteal fibroblasts and osteoblasts

Eight incubations of each cell line were performed. Two 24-well plates were prepared with the previously deter-

mined effective concentration of CoQ (20 $\mu\text{g/ml}$) and Pycnogenol (150 $\mu\text{g/ml}$), alone and in combination with nicotine (250 $\mu\text{g/ml}$).

2.2.3. Effect of optimal concentrations of phytoestrogens[®], alone and in combination with nicotine, on the metabolism of 14C-T by cultured human periosteal fibroblasts and osteoblasts

Two different concentrations of phytoestrogens (10 and 40 $\mu\text{g/ml}$) and nicotine (250 $\mu\text{g/ml}$), alone and in combination were tested in order to study the potential oxidant/antioxidant role of the agents as they were compared to control incubations.

2.3. Detection and quantification of radioactive steroid metabolites

The 24-well multiwell plates were incubated for 24 h in a CO₂ humidified cell culture incubator at 37 °C. Solvent extraction of the medium was performed by the addition of ethyl acetate. The extracts were evaporated to dryness in a vortex evaporator (Gyrovap; Philip Harris House, London, UK). Thin-layer chromatography was performed for separation of formed metabolites and the TLC plates were run in a benzene/acetone solvent system (4:1, v/v). The separated metabolites on the TLC plates were scanned using a radioisotope scanner linked to a computer for their quantification.

The identity of the formed metabolites was confirmed using the mobility of cold standards disclosed in iodine added to the samples. Further confirmation of the authenticity of DHT was done by combined gas chromatography–mass spectrometry (courtesy of Prof. A.I. Mallet, St. Thomas' Hospital, London, UK), after derivatisation to pentafluorobenzyloxime trimethyl silyl ether (PFBO/TMS). The derivatised biological material had a molecular ion (557) and mass spectral fragmentation pattern identical to those of authentic PFBO/TMS ether of 5 α -DHT, but at lower levels, due to smaller concentrations of steroid. These procedures have been documented previously, with the ionic fragmentation pattern in graphic form [61].

2.4. Statistical analysis

Means values were obtained from each of the metabolites isolated from incubations of human periosteal fibroblasts and osteoblasts ($n=8$). The cell lines were not pooled and each cell line relates to the subject. The control incubation in the absence of testing agents served as the comparison for test incubations in the cell lines studied for each experimental set-up. Standard deviations from the mean values are shown in the figures. One-way ANOVA was used for significance testing [62].

3. Results

The substrate 14C-testosterone was mainly metabolized to 5 α -dihydrotestosterone (DHT), diols (D) and 4-androstenedione (4A).

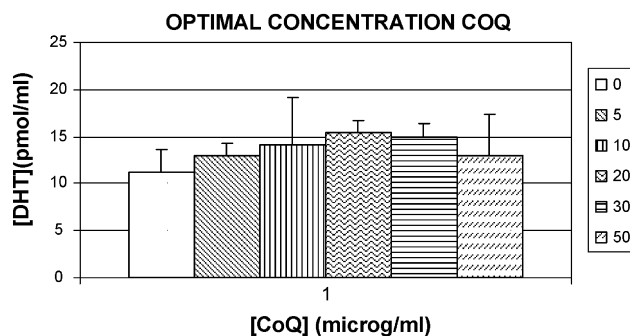


Fig. 1 – DHT production in relation to different concentrations of CoQ (5, 10, 20, 30, and 50 $\mu\text{g/ml}$). The yields of DHT are in pmol/ml. These units are applied to all figures and all metabolites.

3.1. Determination of optimal concentrations of agents used

The results offered here are based on the levels of DHT obtained. The yields of DHT were increased in response to all six concentrations of CoQ used (5, 10, 20, 30, and 50 $\mu\text{g/ml}$) by 15.4, 25.8, 37.4, 33.8, and 15.9%, respectively (Fig. 1). The maximum yields of DHT were obtained at a concentration of CoQ of 20 $\mu\text{g/ml}$. Therefore, this concentration was selected as the optimum one to be used in the next set of experiments.

Serial concentrations of Pycnogenol[®] (50, 100, 150, 200, and 300 $\mu\text{g/ml}$) caused an increase in yields of DHT (Fig. 2) in all cases (of 57.5, 33.6, 86.2, 93.7, and 38.2%, respectively). There were equal amounts of DHT produced by two different concentrations of Pycnogenol[®] (150 and 200 $\mu\text{g/ml}$). The first one (150 $\mu\text{g/ml}$) was selected for use in the next set of experiments.

There was a continuous increase in DHT production from cultured HPF with each concentration of phytoestrogen (Fig. 3) employed (10, 20, 30, 40, and 50 $\mu\text{g/ml}$). There were 33.9, 32.8, 32.2, 38.9, and 40.6% increases in DHT synthesis compared to control values. There was only a slight variation in the yields of DHT within the range of 10 and 40 $\mu\text{g/ml}$. Therefore, the first and last of the range (10 and 40 $\mu\text{g/ml}$) were the selected concentrations to be utilized in subsequent experiments.

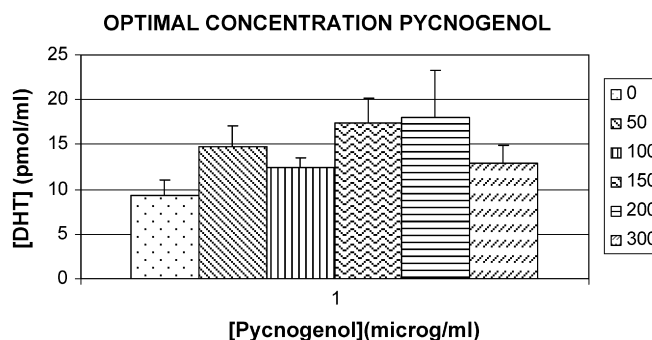


Fig. 2 – Yields of DHT in relation to different concentrations of Pycnogenol[®] (50, 100, 150, 200, and 300 $\mu\text{g/ml}$).

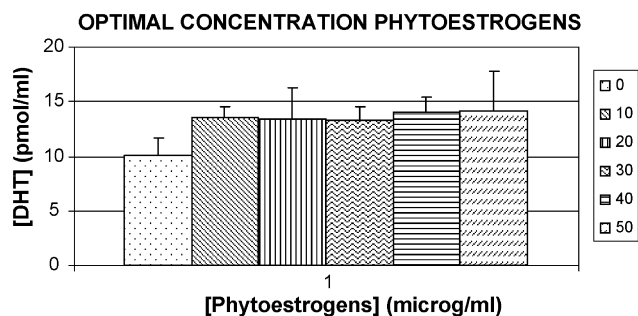


Fig. 3 – Effect of serial concentrations of phytoestrogens (10, 20, 30, 40, and 50 µg/ml) on DHT production.

3.2. Effect of CoQ, Pycnogenol® and nicotine, alone and in combination, on the metabolism of 14C-testosterone

3.2.1. Periosteal fibroblasts

The formation of DHT was increased by 34.3 and 65.8% in response to CoQ (20 µg/ml; $n=8$, $p<0.005$) and Pycnogenol® (150 µg/ml; $n=8$, $p<0.001$), respectively. Nicotine (250 µg/ml) caused 23.8% decrease in DHT production compared with control values ($n=8$, $p<0.05$). The combination of nicotine at 250 µg/ml with CoQ (20 µg/ml) or Pycnogenol® (150 µg/ml) increased the yields of DHT by 84.4 and 66.5%, respectively, compared with incubation with nicotine alone ($n=8$, $p<0.001$ and $n=8$, $p<0.05$, respectively). In addition, these values were increased over baseline controls as well (40.5 and 26.7%, respectively), although, only statistical significance was found for the association of CoQ with nicotine (Fig. 4).

There seemed to be a tendency for decreasing yields of 4A and diols after incubation with all testing agents. However, these results were not statistically significant.

3.2.2. Osteoblasts

CoQ (20 µg/ml) and Pycnogenol® (150 µg/ml) showed consistent stimulatory effects on DHT synthesis of 53.9 and 97.3%, respectively, compared to control values ($n=8$, $p<0.05$ and $p<0.005$). The yields of DHT were significantly reduced (43.3%) in response to nicotine (250 µg/ml) compared to control incubations ($n=8$, $p<0.05$). The combination of nicotine with CoQ or Pycnogenol® caused 1.3- and 1.5-fold increases, respec-

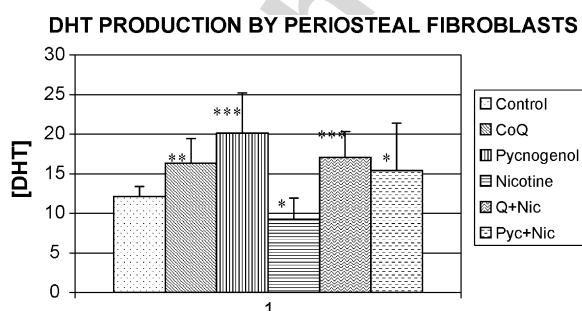


Fig. 4 – Yields of DHT synthesised by cultured human periosteal fibroblasts after incubation with CoQ (20 µg/ml), Pycnogenol® (150 µg/ml) and nicotine (250 µg/ml) alone and in combination. Comparison of treatment vs. control group: * $p<0.05$; ** $p<0.005$; *** $p<0.001$.

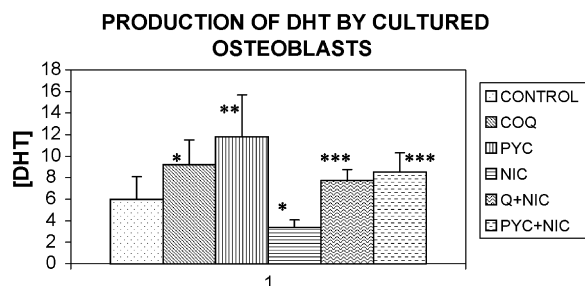


Fig. 5 – Metabolism of 14C-testosterone to DHT by cultured osteoblasts after incubation with CoQ (20 µg/ml), Pycnogenol® (150 µg/ml) and nicotine (250 µg/ml) alone and in combination. Comparison of treatment vs. control group: * $p<0.05$; ** $p<0.005$; *** $p<0.001$.

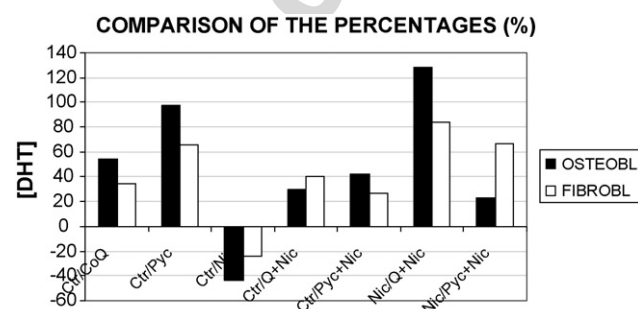


Fig. 6 – Differences in DHT production by cultured human osteoblasts and human periosteal fibroblasts compared to control values.

tively, in DHT production over incubation with nicotine alone ($n=8$, $p<0.001$), being significantly greater than controls (by 29.4 and 42.7%, respectively; $n=8$, $p<0.05$) (Fig. 5).

There was a general trend of decreased 4A synthesis in response to the above agents (of 30.7, 49.2, 47.6, 62.4, and 68.2% compared to control values, respectively), while there was a tendency for the yields of diols to increase (by 9, 127.4, 69.7, 120.7, and 221.4% compared to control values, respectively). These results were predominantly significant at a level of $p<0.05$, except for CoQ alone and in combination with nicotine.

3.3. Periosteal fibroblasts versus osteoblasts

Considering responses to individual agents, there were higher percentages of increases and decreases in cultured human osteoblasts than in cultured human periosteal fibroblasts. However periosteal fibroblasts showed a higher threshold of activity than osteoblastic cells, with greater amounts of DHT produced (Figs. 6 and 7).

3.4. Effect of phytoestrogens and nicotine, alone and in combination on androgen metabolism using 14C-testosterone as substrate

3.4.1. Periosteal fibroblasts

Phytoestrogens, at concentrations of 10 and 40 µg/ml, caused a stimulatory effect on DHT synthesis. These increases were

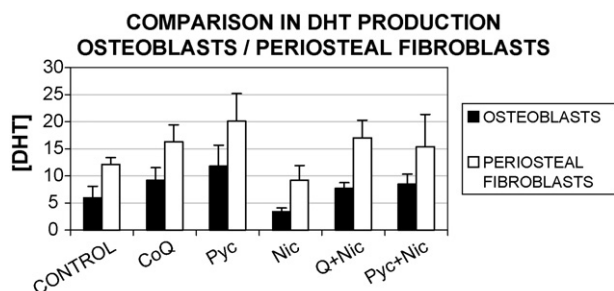


Fig. 7 – Yields of DHT produced by cultured human osteoblasts after incubation with CoQ, Pycnogenol®, nicotine, and their combinations compared to the yields of DHT produced by cultured human fibroblasts after incubation with the same testing agents.

80.3 and 66.3%, respectively, compared to the control value ($n=8$, $p<0.001$ in both cases). Nicotine showed consistent inhibitory effects on DHT synthesis by 33.7% ($n=8$, $p<0.005$). The combination of nicotine with phytoestrogens at 10 and 40 $\mu\text{g/ml}$ further stimulated the yield of DHT by 88.6% ($n=8$, $p<0.001$) and 99.9% ($n=8$, $p<0.005$) compared with incubations with nicotine alone. In addition these associations showed an increase over control values by 25% ($n=8$, $p<0.05$) and 32.6% ($n=8$, $p=0.08$) (Fig. 8).

The yields of 4A were significantly increased in response to all testing agents alone (phytoestrogens at 10 and 40 $\mu\text{g/ml}$ and nicotine) by 54.4% ($n=8$, $p<0.05$), 59.1% ($n=8$, $p<0.005$), and 57.2% ($n=8$, $p<0.05$), respectively, compared to control values. The combination of phytoestrogens (10 and 40 $\mu\text{g/ml}$) with nicotine decreased 4A yields by 16.5 and 7%, respectively, comparing them to incubations with nicotine alone. However, the results were not statistically significant.

Only slight changes in yields of diols were observed. None of them were statistically significant. There was a general trend of increased synthesis of diols in response to phytoestrogens (10 and 40 $\mu\text{g/ml}$) and of decreased yields of diols in response to nicotine alone or in combination with phytoestrogens.

3.4.2. Osteoblasts

Incubations of cultured human osteoblasts with phytoestrogens (10 and 40 $\mu\text{g/ml}$) resulted in a consistent stimulatory

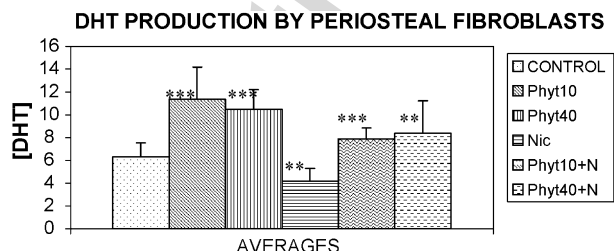


Fig. 8 – Metabolic conversion of 14C-testosterone to DHT by human cultured periosteal fibroblasts in response to two different concentrations of phytoestrogens (10 and 40 $\mu\text{g/ml}$) and nicotine, alone and in combination. Comparison of treatment vs. control group: ** $p<0.005$; * $p<0.001$.**

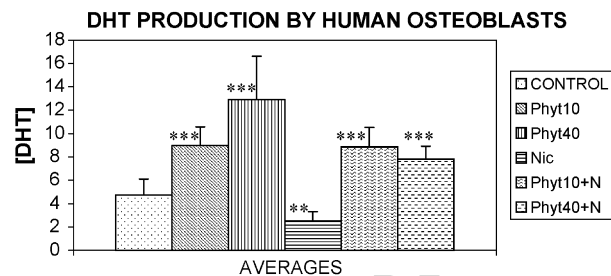


Fig. 9 – Metabolism of 14C-testosterone to DHT by cultured osteoblasts after incubation with two different concentrations of phytoestrogens (10 and 40 $\mu\text{g/ml}$) and nicotine (250 $\mu\text{g/ml}$) alone and in combination. Comparison of treatment vs. control group: ** $p<0.005$; * $p<0.001$.**

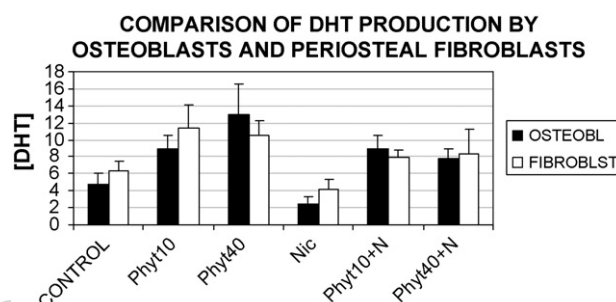


Fig. 10 – Yields of DHT produced by human cultured osteoblasts after incubation with phytoestrogens (10 and 40 $\mu\text{g/ml}$), nicotine (250 $\mu\text{g/ml}$) alone and in combination compared to the yields of DHT produced by human cultured fibroblasts after incubation with the same testing agents.

effect on DHT synthesis of 88.7 and 171.7%, respectively, compared to control incubations ($n=8$, $p<0.001$). Nicotine (250 $\mu\text{g/ml}$) inhibited the formation of DHT by 47.4% ($n=8$, $p<0.005$) over control values. The combination of nicotine with phytoestrogens at 10 and 40 $\mu\text{g/ml}$ caused 2.5- and 2-fold increases in the formation of DHT by cultured human osteoblasts compared to incubations with nicotine alone ($n=8$, $p<0.001$) (Fig. 9).

There was a general tendency of increased yields of 4A and diols after incubation with all testing agents alone (phytoestrogens 10 and 40 $\mu\text{g/ml}$, and nicotine 250 $\mu\text{g/ml}$) compared to control values. These data were only significant for 4A ($n=8$, $p<0.05$). The combination of nicotine with phytoestrogens (10 or 40 $\mu\text{g/ml}$) resulted in statistically non-significant increases in 4A and diols yields compared with incubations with nicotine alone.

3.4.3. Periosteal fibroblasts versus osteoblasts

There was not a clear difference between both types of cells regarding the total amounts of DHT produced. However, as shown earlier, there were higher percentages of increases and decreases in human cultured osteoblasts than in cultured human periosteal fibroblasts (Figs. 10 and 11).

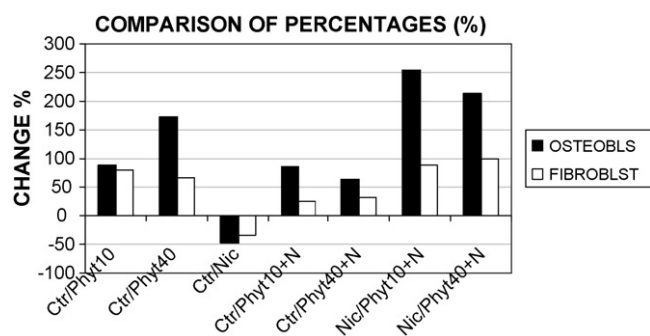


Fig. 11 – Differences in DHT production by human cultured osteoblasts and human cultured periosteal fibroblasts compared to control values.

4. Discussion

The *in vitro* antioxidant/oxidant effects of different testing agents have been studied here, looking for an *in vivo* application to patients with periodontal disease. An *in vitro* study with two different cell types, human osteoblasts and human periosteal fibroblasts, was performed in order to analyse the effects of one oxidative agent (nicotine) and three antioxidants (CoQ, Pycnogenol®, and phytoestrogens) with a defined activity in the treatment of several systemic diseases [4,63–68]. The incubations with nicotine resulted in a dramatic reduction in the levels of DHT, a physiologically active androgen implicated in stimulating matrix-forming cells [48] and with documented evidence of anabolic activity [52,53]. By contrast, when incubations with antioxidants were done, the levels of DHT not only recovered to their control values, but they also overcame the effects of the oxidants. This suggests that the catabolic effects of nicotine could be reversed by the addition of antioxidants such as CoQ, Pycnogenol® or phytoestrogens.

We expected that stimulation in DHT synthesis would result in a depletion of 4A and an increase in yields of diols, due to the reaction catalysed by 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (17 β -HSD) towards formation of testosterone and DHT. However, these results were only obtained after incubation of human osteoblasts with CoQ, Pycnogenol® and nicotine. In all other sets of experiments there was no clear tendency in yields of 4A and diols. This could be explained by the concentrations employed being sufficiently high to show a stimulatory response in DHT synthesis but not strong enough to see changes in levels of 4A or diols.

As a general trend we observed that fibroblasts were able to produce higher levels of DHT than osteoblasts, even in non-stimulated cases (control). However, osteoblasts were more influenced by the addition of antioxidants/oxidants, as shown by their capacity to induce greater changes in yields of DHT (increases or decreases). In the case of phytoestrogens, this heterogeneity could be attributed to their estrogenic properties. In bone cell cultures, estrogen receptors (ER) have a different pattern of expression depending on the osteoblast developmental stage [69]. During early phases, the levels of ER- α and ER- β are both elevated, with a decrease in ER- α in postmineralizing cultures [69]. Osteoblasts from the cell line MG63 are mature cells, where expression of ER- β has been

established [70]. Phytoestrogens preferentially bind to the ER- β isoform [23,25]; therefore, they would be able to exert their effects through binding to this estrogen receptor. The fact that the ER- β expression is increased in this type of cell would allow a greater action of phytoestrogens in terms of reducing oxidative stress.

Pycnogenol® is formed by a mixture of different compounds. Among them, flavonoids are the main components [15–17]. Flavonoids belong to the group of phytoestrogens [24–27], and therefore, they could also bind to ER- β , and induce greater changes in testosterone metabolism.

4.1. Nicotine as an oxidative agent

Previous reports have revealed that smokers have poorer periodontal status compared to that of non-smokers [32–34]. These observations can be confirmed with the results obtained here, where the incubation of cultured human periosteal fibroblasts and osteoblasts with nicotine at a concentration of 250 μ g/ml resulted in a significant decrease in DHT yields compared to control values (from 23.8 to 47.4% depending on the type of cell and experiment). Our results are in agreement with those of Soory and Suchak [44]. They observed an inhibitory effect of 5 α -reductase activity on cultured gingival and oral periosteal fibroblasts after incubations with nicotine (30, 50, and 100 μ g/ml).

A dichotomous effect of nicotine in tissues has been proposed [43–46], with a stimulatory effect on 5 α -reductase activity when incubations with low concentrations of nicotine are performed [44] in bone cell cultures [45,46] and in gingival fibroblasts [43]; and an inhibitory effect when higher concentrations were employed [43,44].

The mechanism by which nicotine exerts its detrimental effects is not completely understood. Some *in vitro* studies have tested the effects of nicotine not only in oral tissues [36,39,71] but also in all body tissues [42,45,72]. Although several hypotheses have been proposed, the role of nicotine as an oxidative agent is probably the most documented one [36].

Alterations in cellular glutathione (GSH) levels have been proposed as one mechanism responsible for the deleterious effects attributed to nicotine. GSH is a small tripeptide responsible for the regulation of the intracellular levels of ROS, and therefore, acts as an antioxidant. Total GSH involves GSH and GSSG. During oxidative stress, GSH peroxidase reduces GSH to its oxidizing form GSSG [40,41]. Nicotine-induced GSH depletion has been demonstrated in cultured human periodontal ligament fibroblasts (HPLF) [39–41] and in rat kidney tissues [42]. These results could serve to explain another potential mechanism by which nicotine could exert its effects in periodontal tissues. It would make cells more vulnerable to other reactive agents present in dental plaque, via depletion of GSH levels [39].

Tanko and Christiansen [73], have suggested another possible mechanism of action for nicotine. They proposed that part of the detrimental effect of smoking in bone metabolism is mediated by an adverse influence on sex-steroid metabolism, and in particular by an estrogen-lowering effect.

It is worth taking into account that epithelial cells are the first to come in contact with nicotine. They act as a barrier limiting the contact of nicotine with deeper cells, such

as fibroblasts or osteoblasts. However, in inflamed gingiva affected by periodontal disease, the intercellular spaces may be wider, thus permitting the penetration of nicotine through the epithelial barrier, and allowing a direct contact with fibroblasts [43].

4.2. CoQ, Pycnogenol® and phytoestrogens as antioxidant agents

4.2.1. Coenzyme Q10

The incubation of both types of cells with CoQ resulted in a significant increase in DHT yields (34.3 and 53.9% by periosteal fibroblasts and osteoblasts, respectively). The association of CoQ with nicotine increased DHT production by 84.4 and 128.2% in periosteal fibroblasts and osteoblasts, respectively, over incubations with nicotine alone. The ability of CoQ to increase the metabolism of androgens (14C-testosterone) in cultured human osteoblasts and periosteal fibroblasts in response to the oxidative agent nicotine serves to confirm the possible role of CoQ as an antioxidant in the treatment of tissues affected by inflammatory diseases (periodontal diseases). That would imply a benefit in the healing process with a specific impact among smokers. We have demonstrated that CoQ was capable of inducing a recovery of the levels of DHT up to control values, and also with further increases.

CoQ has been proved to be a potent antioxidant *in vitro* [74] and *in vivo* studies [75]. It has been proposed as a potential treatment for mitochondrial diseases [74,76] and for vascular diseases [77] in type 2 diabetes patients [78]. Hanioka et al. [10] designed a clinical trial to assess the effects of topical application of CoQ in periodontal pockets. They reported that CoQ was able to improve adult periodontitis as a unique method or in combination with non-surgical therapy. However, the formulation of CoQ dispersed in soybean oil could be non-specific. It is well documented that soybean oil is mainly composed of phytoestrogens, potent antioxidants, and as a consequence, these results could reflect an effect erroneously attributed to CoQ, instead of to phytoestrogens or even to the combination of both agents.

4.2.2. Pycnogenol®

Incubations of cells with Pycnogenol® resulted in increases in DHT levels even higher than those obtained with CoQ (65.8 and 97.3% by periosteal fibroblasts and osteoblasts, respectively). When combined with nicotine and glucose, Pycnogenol® was also capable of neutralizing the effects of both oxidants and obtaining a recovery in DHT yields over control values.

The antioxidant properties of Pycnogenol® have been reviewed by Packer et al. [17] and several authors have demonstrated its ability to scavenge ROS and NOS (nitrite species) [17,19,20,79–81]. It has been shown to enhance other antioxidant systems such as α -tocopherol (10 μ g/ml) [79,82] and even minimal concentrations (2.5 μ g/ml) have been shown to protect pigmented epithelium of the retina from lipid peroxidation induced *in vitro* by ferric iron [83].

Pycnogenol® has been proposed as a treatment for skin diseases characterized by cutaneous inflammation. It has been applied to prevent ultraviolet (UV)-induced inflammation in human skin; in a group of 21 volunteers taking 1.1 mg/(kg day) during 4 weeks, it increased the dose of ultraviolet

(UV)-radiation necessary to induce erythema [84]. Experimental studies have tested the properties of topically applied Pycnogenol® in rats or mice [20,85]. These authors demonstrated its anti-inflammatory activity in either wound healing [20] or in UV-irradiated tissues [85].

Pycnogenol® is also capable of dose-dependently down regulating IFN- γ -induced ICAM-1 expression in human keratinocytes at concentrations varying from 5 to 50 μ g/ml [86]. ICAM-1 is responsible for the adhesion of T cell to human keratinocytes, and its levels are increased in gingival crevicular fluid from periodontal patients compared to healthy subjects [87]; therefore, Pycnogenol® could be applied to damaged periodontal tissues in order to diminish their levels of ICAM-1, and help in the process of healing.

Another potential link with periodontal disease is that Pycnogenol® exerts a strong inhibitory effect on the activity of metalloproteinase-1 (MMP-1), MMP-2, and MMP-9 [22]. The production of some cytokines, such as interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-2 are also inhibited by Pycnogenol® (20 or 50 μ g/ml) in human T lymphocyte and in a murine cell line of monocyte-macrophages [80]. This may in part explain the effect of Pycnogenol® in protecting periodontal tissues during excessive immune-inflammatory reactions.

Based on this hypothesis, Kimbrough et al. [16] showed a reduction in the mean bleeding scores of 50% in a group of healthy patients after 14 days of chewing six pieces of Pycnogenol® (5 mg) daily. By contrast, Battino et al. [1] could not demonstrate any protective effect of a Pycnogenol®-enriched toothpaste extract in human keratinocytes cell cultures 48 h prior to challenging them with hydroxide peroxide (150 μ M). This could be a reflection of the source material or concentrations used.

4.2.3. Phytoestrogens

The highest values in DHT yields were obtained when incubations with phytoestrogens (10 and 40 μ g/ml) were made, with increases of 66.3 and 171.7% in periosteal fibroblasts and osteoblasts, respectively. When phytoestrogens were associated with nicotine, the production of DHT was enhanced by 99.9 and 255.2% by periosteal fibroblasts and osteoblasts, respectively.

Some of the beneficial effects of phytoestrogens have been attributed to their role as antioxidant agents [31]. Genistein and daidzein (500, 200, 100, and 1000 μ M) have been proved to mop up free radicals (hydroxyl and superoxide anion) in a murine cell line of monocyte-macrophages (RAW 264.7 cells), although to a lesser extent than their own metabolites [31]. When lower concentrations of daidzein and genistein were tested, results failed to demonstrate a scavenging activity towards ROS [88]. Therefore, it has been proposed that their antioxidant properties at this physiological concentration might be attributed to their capacity of enhancing other antioxidant enzymes. Guo et al. [88] have demonstrated a biphasic effect of some phytoestrogens. Daidzein at a concentration of 0.005–5 μ M and genistein (0.005 μ M) increased cellular levels of GSH, while higher concentrations (50 μ M) lead to a considerable depletion in intracellular GSH in a human umbilical cord vein endothelial cell line. As it was previously explained, nicotine reduces the levels of GSH [39–42], so that, an appropriate concentration of phytoestrogens would be

capable of counteracting this action, preventing the damaging effects of nicotine in periodontal tissues. In our study, we have shown that phytoestrogens were capable of reversing the negative effects exerted by nicotine in cultured human osteoblasts and periosteal fibroblasts by enhancing 5 α -reductase activity, increasing the amounts of DHT yields produced by both types of cells over control values. This corroborates previous results where phytoestrogens have been demonstrated to act as antioxidants in cells affected by oxidative stress [31].

Phytoestrogens also have the ability to bind to estrogen receptors (ERs) thanks to their structural similarity with the molecule of estrogen [23,25,89]. This confers on them the possibility of having estrogenic properties, without experiencing the side-effects that characterize estrogen (increase in breast cancer) [89].

This is the first study showing that these agents play an important role in the metabolism of androgens as markers of oxidative stress [54–56] in two types of human cells, periosteal fibroblasts and osteoblasts. Therefore, we can conclude that:

1. Nicotine significantly inhibits 5 α -reductase activity, resulting in a decrease in DHT yields in cultured human periosteal fibroblasts and osteoblasts.
2. CoQ, Pycnogenol® and phytoestrogens are capable of increasing the levels of DHT in cultured human periosteal fibroblasts and osteoblasts, confirming their role as antioxidants.
3. The combination of nicotine with CoQ, Pycnogenol® or phytoestrogens resulted in a neutralization of the effects of nicotine on testosterone metabolism in cultured human periosteal fibroblasts and MG63 osteoblasts.
4. Cultured human osteoblasts show greater changes in testosterone metabolism than cultured human periosteal fibroblasts when incubated with nicotine, CoQ, Pycnogenol®, and phytoestrogens.
5. CoQ, Pycnogenol®, and phytoestrogens could be employed as adjunctive measures for the treatment of periodontal patients, especially among smokers and diabetic patients.
6. Future research is needed in this field, in order to enhance existing knowledge.

Acknowledgment

The authors wish to thank Paula Coward for her assistance at the Dental Clinical Research Laboratory.

REFERENCES

- [1] Battino M, Ferreiro MS, Armeni T, Polit A, Bonpadre S, Massoli A, et al. In vitro antioxidant activities of antioxidant-enriched toothpastes. *Free Radic Res* 2005;39:3433–50.
- [2] Soory M. Biomarkers of diabetes mellitus and rheumatoid arthritis associated with oxidative stress, applicable to periodontal diseases. *Curr Top Steroid Res* 2004;4:1–17.
- [3] Sen CK, Khanna S, Gordillo G, Bagchi D, Bagchi M, Roy S. Oxygen, oxidants and antioxidants in wound healing. *Ann NY Acad Sci* 2002;957:239–49.
- [4] Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002;82:47–95.
- [5] Nakamura R, Littarru GP, Folkers K, Wilkinson EG. Deficiency of Coenzyme Q in gingiva of patients with periodontal disease. *Int J Vitamin Nutr Res* 1973;43:84–92.
- [6] Nakamura R, Littarru GP, Folkers K, Wilkinson EG. Study of CoQ₁₀-enzymes in gingiva from patients with periodontal disease and evidence for a deficiency of Coenzyme Q10. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974;71(4):1456–60.
- [7] Watts TLP, Coenzyme. Q10 and periodontal treatment: is there any beneficial effect? *Br Dent J* 1995;178:209–13.
- [8] Littarru G, Nakamura R, Ho L, Folkers K, Kuzell WC. Deficiency of Coenzyme Q₁₀ in gingival tissue from patients with periodontal disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971;68:2332–5.
- [9] Matsumura T, Saji S, Nakamura R, Folkers K. Evidence for enhanced treatment of periodontal disease by therapy with coenzyme Q. *Int J Vitamin Nutr Res* 1973;43(4):537–48.
- [10] Hanioka T, Tanaka M, Ojima M, Shizukuishi S, Folkers K. Effect of topical application of Coenzyme Q10 on adult periodontitis. *Mol Aspects Med* 1994;15(Suppl):s241–8.
- [11] Nylander M, Weiner J, Norlund M. A double blind clinical dose-response study on effects of CoQ10 on gingival bleeding/periodontal disease. In: *Proceedings of the Seventh International Symposium on Trends in Biomedicine in Finland, Suppl 8*. 1996. p. 1–7.
- [12] Lunn R, Rawlinson A, Walsh T, Hodges SJ. Coenzyme Q10 is lower in gingival crevicular fluid in periodontitis. In: *Conference Paper, Meeting of Society of Nordic Odontology*. 1997. p. 1–6.
- [13] Liu X, Zhou HJ, Rohdewald P. French maritime pine bark extract pycnogenol dose-dependently lowers glucose in Type 2 diabetic patients (Letters: Observations). *Diabet Care* 2004;27:839–40.
- [14] Winkler-Stuck K, Wiedemann FR, Wallesh CW, Kunz WS. Effect of Coenzyme Q10 on the mitochondrial function of skin fibroblasts from Parkinson patients. *J Neurol Sci* 2004;220:41–8.
- [15] Ni Z, Mu Y, Gulati O. Treatment of melasma with Pycnogenol®. *Phytother Res* 2002;16:567–71.
- [16] Kimbrough C, Chun M, de la Roca G, Lau BH. Pycnogenol chewing gum minimises gingival bleeding and plaque formation. *Phytomedicine* 2002;9(5):410–3.
- [17] Packer L, Rimbach G, Virgili F. Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, Pycnogenol. *Free Radic Biol Med* 1999;27:704–24.
- [18] Siler-Marsiglio K, Paiva M, Madorky I, Serrano Y, Neeley A, Hearton MB. Protective mechanisms of Pycnogenol® in ethanol-insulted cerebellar granule cells. *Int J Neurobiol* 2004;61:267–76.
- [19] Blasó G, Gabor M, Sibbel R, Rohdenwald P. Antiinflammatory and superoxide radical scavenging activities of procyanidins containing extract from the bark of *Pinus pinaster* Sol and its fractions. *Pharm Pharmacol* 1994;3:217–20.
- [20] Blasó G, Gábor M, Schönlav T, Rohdewald P. Pycnogenol® accelerates wound healing and reduces scar formation. *Phytother Res* 2004;18:579–81.
- [21] Pereira CM, Oliveira CR. Glutamate toxicity on a PC12 cell line involves glutathione (GSH) depletion and oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1997;23:637–47.
- [22] Grimm T, Schüfer A, Högger P. Antioxidant activity and inhibition of matrix metalloproteinases by metabolites of maritime pine bark extract (Pycnogenol®). *Free Radic Biol Med* 2004;36(6):811–22.
- [23] Magee P, Rowland JR. Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer. *Br J Nutr* 2004;91(4):513–31.

- [24] Dang ZC, Lowik C. Dose-dependent effects of phytoestrogens on bone. *Trends Endocrinol Metab* 2005;16(5): 207-13.
- [25] Dijsselbloem N, Berghe WW, Naeyer AD, Haegeman G. Soy isoflavone phyto-pharmaceuticals in IL-6 affections. Multi-purpose nutraceuticals at the crossroad of hormone replacement, anticancer and anti-inflammatory therapy. *Biochem Pharmacol* 2004;68:1171-85.
- [26] Whitehead SA, Cross JE, Burden C, Lacey M. Acute and chronic effects of genistein, tyrophostin and lavendustin A on steroid synthesis in luteinized human granulosa cells. *Hum Reprod* 2002;17(3):589-94.
- [27] Whitehead SA, Lacey M. Phytoestrogens inhibit aromatase but not 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) type 1 in human granulosa-luteal cells: evidence for FSH induction of 17 β -HSD. *Hum Reprod* 2003;18(3):487-94.
- [28] Oh HY, Kim SS, Chung H-Y, Yoon S. Isoflavone supplements exert hormonal and antioxidant effects in postmenopausal Korean women with diabetic retinopathy. *J Med Food* 2005;8(1):1-7.
- [29] Barnes S, Grubbs C, Setchell KD, Carlson J. Soybeans inhibit mammary tumors in models of breast cancer. *Prog Clin Biol Res* 1990;347:239-53.
- [30] Ji S, Willis GM, Frank R, Cornelius SG, Spurlock ME. Soybean isoflavones, genistein and genistin, inhibit rat myoblast proliferation, fusion and myotube protein synthesis. *J Nutr* 1999;129:1291-7.
- [31] Rimbach G, De Pascual-Teresa S, Ewins BA, Matsugo S, Uchid Y, Minihane AM. Antioxidant and free radical scavenging activity of isoflavone metabolites. *Xenobiotica* 2005;33(9):913-25.
- [32] Johnson GK, Hill M. Cigarette smoking and the periodontal patient. *J Periodontol* 2004;75:196-209.
- [33] Bergstrom J. Tobacco smoking and chronic destructive disease. *Odontology* 2004;92:1-8.
- [34] Ribera-Hidalgo F. Smoking and periodontal disease. *Periodontology* 2000 2003;32:50-6.
- [35] Yildiz D, Ercal N, Armstrong DW. Nicotine enantiomers and oxidative stress. *Toxicology* 1998;130:155-65.
- [36] Argentin G, Cicchetti R. Genotoxic and apoptotic effect of nicotine on human gingival fibroblasts. *Toxicol Sci* 2004;79:75-81.
- [37] Van der Vaart H, Postma DS, Timens W, Hacken NHT. Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. *Thorax* 2004;59:713-21.
- [38] Crowley-Weber CL, Duorakova K, Crowley C, Bernstein H, Bernstein C, Garewal H, et al. Nicotine increases oxidative stress, activates NF- κ B and GRP78, induces apoptosis and sensitizes multiple stress inducer, deoxycholate: relevance to colon carcinogenesis. *Chemico-Biol Interact* 2003;145:53-66.
- [39] Chang Y-C, Huang F-M, Tai K-W, Yang L-C, Chou M-Y. Mechanisms of cytotoxicity of nicotine in human periodontal ligament fibroblast cultures in vitro. *J Periodont Res* 2002;37:279-85.
- [40] Chang Y-C, Hsieh Y-S, Lii C-K, Huang F-M, Tai K-W, Chou M-Y. Induction of c-fos expression by nicotine in human periodontal ligament fibroblasts is related to cellular thiol levels. *J Periodont Res* 2003;38:44-50.
- [41] Chang YC, Tsai CH, Yang SH, Liu CM, Chou MY. Induction of cyclooxygenase-2 mRNA and protein expression in human gingival fibroblasts stimulated with nicotine. *J Periodont Res* 2003;38:496-501.
- [42] Cygremis Y, Turkoz Y, Akgoz M, Sozmen M. The effects of chronic exposure to ethanol and cigarette smoke on the level of reduced glutathione and malondialdehyde in rat kidney. *Urol Res* 2004;32(3):213-8.
- [43] Giannopoulou C, Roehrich N, Mombelli A. Effect of nicotine-treated epithelial cells on the proliferation and collagen production of gingival fibroblasts. *J Clin Periodontol* 2001;28:769-75.
- [44] Soory M, Suchak A. Effects of alkaline phosphatase and its inhibitor levamisole on the modulation of androgen metabolism by nicotine and minocycline in human gingival and oral periosteal fibroblasts. *Arch Oral Biol* 2003;48: 69-76.
- [45] Gullihorn L, Karpman R, Lippiello L. Differential effects of nicotine and smoke condensate on bone cell metabolic activity. *J Orthop Trauma* 2005;19:17-22.
- [46] Walter LM, Preston MR, Magnay JL, Thomas PBM, El Hajaj AJ. Nicotinic regulation of c-fos and osteopontin expression in human derived osteoblast-like cells and human trabecular bone organ culture. *Bone* 2001;28(6):603-8.
- [47] Peacock ME, Sutherland DE, Schuster GS, Brenan WA, O'Neal RB, Strong SL. The effect of nicotine on reproduction and attachment of human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol* 1993;64:658-65.
- [48] Vittek J, Rappaport SC, Gordon GG, Munnangi PR, Southren AL. Concentration of circulating hormones and metabolism of androgens by human gingiva. *J Periodontol* 1979;50(5):254-64.
- [49] Parkar MH, Newman HN, Olsen I. Polymerase chain reaction analysis of oestrogen and androgen receptor expression in human gingival and periodontal tissue. *Arch Oral Biol* 1996;41(10):979-83.
- [50] Issa S, Schnabel D, Feix M, Wolf L, Schaefer H, Russel DW. Human osteoblast-like cells express predominantly steroid 5 α -reductase type 1. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:5401-7.
- [51] Vanderschueren D, Vandendput L, Boonen S, Lindberg MK, Bouillon R, Ohlsson C. Androgens and bone. *Endocr Rev* 2004;25:389-425.
- [52] Tilakaratne A, Soory M. Effects of the anti-androgen finasteride on 5 α -reduction of androgens in the presence of progesterone in human gingival fibroblasts: modulatory actions of the alkaline phosphatase inhibitor levamisole. *J Periodont Res* 2000;35:179-85.
- [53] Coxam V, Bowman BM, Meecham M, Roth CM, Miller MA, Miller SC. Effects of dihydrotestosterone alone and in combination with oestrogen on bone mineral density, bone growth and formation rates in ovariectomised rats. *Bone* 1996;19:107-14.
- [54] Allen JA, Diemer T, Janus P, Hales KH, Hales DB. Bacterial endotoxin lipopolysaccharide and reactive oxygen species inhibit Leydig cell steroidogenesis via perturbation of mitochondria. *Endocrine* 2004;25:265-75.
- [55] Pang ST, Dillner K, Wu X, Pousette A, Norstedt G, Flores-Morales A. Gene expression profiling of androgen deficiency predicts a pathway of prostate apoptosis that involves genes related to oxidative stress. *Endocrinology* 2002;143:4897-906.
- [56] Morin C, Zini R, Simon N, Tillement JP. Dehydroepiandrosterone and alpha-estradiol limit the functional alterations of rat brain mitochondria submitted to different experimental stresses. *Neuroscience* 2002;115:415-24.
- [57] Sooriyamoorthy M, Gower DB. Hormonal influences on gingival tissue: relationship to periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1989;16:201-8.
- [58] Sooriyamoorthy M, Gower DB, Eley BM. Androgen metabolism in gingival hyperplasia induced by nifedipine and cyclosporine. *J Periodont Res* 1990;5:25-30.
- [59] Ojanotko A, Nienstedt W, Harri MP. Metabolism of testosterone by human healthy and inflamed gingiva in vitro. *Arch Oral Biol* 1980;25:481-4.
- [60] Billiau A, Edy VG, Heremans H, Van Damme J, Desmyter J, Georgiades JA, et al. Human interferon: mass production in a newly established cell line, MG-63. *Antimicrob Agents Chemother* 1977;12:11-5.

Cambios hormonales asociados al embarazo. Afectación gingivo-periodontal

FIGUERO-RUIZ E*
PRIETO PRIETO I**
BASCONES-MARTÍNEZ A***

Figuero-Ruiz E, Prieto Prieto I, Bascones-Martínez A. *Cambios hormonales asociados al embarazo. Afectación gingivo-periodontal*. *Av Periodon Implantol*. 2006; 18, 2: 101-113.

RESUMEN

La gingivitis gravídica es una inflamación proliferativa, vascular e inespecífica con un amplio infiltrado inflamatorio celular. Clínicamente se caracteriza por una encía intensamente enrojecida que sangra fácilmente, por un engrosamiento del margen gingival y por hiperplasia de las papilas interdentes que pueden dar lugar a la aparición de pseudobolsas. La prevalencia varía entre el 35 y el 100% de las embarazadas con gingivitis previa.

Aunque parece que durante el embarazo la susceptibilidad de los tejidos gingivales a la inflamación está relacionada con los cambios hormonales propios del mismo, el mecanismo exacto por el cual estas hormonas incrementan la inflamación gingival es desconocido. El cambio hormonal más significativo es el incremento en la producción de estrógeno y progesterona.

La respuesta de los tejidos a las hormonas sexuales femeninas va a depender del tipo de hormona circulante, de la proporción de estrógeno/progesterona, así como de la concentración tisular de la hormona. Sus efectos a nivel del tejido gingival son variados y tienden a ser clasificados en cuatro grandes grupos: cambios vasculares, cambios celulares, cambios microbiológicos y cambios inmunológicos.

PALABRAS CLAVE

Gingivitis. Embarazo. Granuloma gravídico. Estrógenos. Progesterona. Patogénesis. Diagnóstico.

Aceptado para publicación: Noviembre 2005.

INTRODUCCIÓN

El embarazo es una condición en la que se encuentra la mujer durante un periodo de unos nueve meses,

desde la fecundación del cigoto hasta el parto. Se caracteriza por una serie de cambios sistémicos en diferentes niveles del organismo tales como alteraciones endocrinas, con un incremento en la producción de

* Licenciada en Odontología (UCM). Becaria de investigación del Ministerio de Educación. Postgrado de Periodoncia (UCM). Departamento de Medicina y Cirugía Bucofacial (Estomatología III). Facultad de Odontología. Universidad Complutense de Madrid. España.

** Doctor en Odontología (UCM). Postgrado de Periodoncia (UCM). Departamento de Medicina y Cirugía Bucofacial (Estomatología III). Facultad de Odontología. Universidad Complutense de Madrid. España.

*** Catedrático de Medicina Bucal y Periodoncia. Departamento de Medicina y Cirugía Bucofacial (Estomatología III). Facultad de Odontología. Universidad Complutense de Madrid. España.

estrógenos y progesterona; cambios a nivel cardiovascular con un aumento en el volumen plasmático y en el gasto cardíaco; cambios pulmonares, caracterizados por un aumento en el volumen de aire circulante e incluso la aparición de disnea; cambios a nivel gastrointestinal, con una alteración de los hábitos alimentarios (incremento en el consumo de azúcares) y aparición de náuseas y vómitos; y cambios hematológicos, con una disminución del hematocrito, de la tasa de hemoglobina y del número de eritrocitos (1).

A nivel bucal se ha descrito la aparición de ciertas alteraciones gingivo-periodontales, existiendo determinadas patologías propias, tales como la gingivitis del embarazo o el granuloma gravídico (2-4). La **gingivitis del embarazo** o gingivitis gravídica, es una inflamación proliferativa, vascular e inespecífica con un amplio infiltrado inflamatorio celular. Clínicamente se caracteriza por una encía intensamente enrojecida que sangra fácilmente por un engrosamiento del margen gingival y por hiperplasia de las papilas interdentes que pueden dar lugar a la aparición de pseudobolsas (5-8). Løe y Silness (9) en 1963 describen que los primeros síntomas aparecen en el segundo mes de embarazo y continúan hasta el octavo mes, momento a partir del cual se observa cierta mejoría para estabilizarse finalmente tras el parto. Los estudios clínicos muestran una prevalencia que varía entre el 35 y el 100% de las embarazadas con gingivitis previa. Sin embargo, su incidencia es de tan sólo 0,03% en aquellas mujeres libres de placa al inicio del embarazo y con buenos hábitos de higiene oral durante el mismo (9,10).

El **granuloma gravídico**, también llamado tumor del embarazo, es una reacción inflamatoria proliferativa fi-

brovascular exagerada con relación a un estímulo ordinario localizada fundamentalmente en la encía (11). Se describe como una masa localizada roja o roja-amorata, nodular o ulcerada que sangra fácilmente y que aparece frecuentemente en mujeres (0,5-5%) en torno al segundo trimestre del embarazo y crece a lo largo del mismo alcanzando un tamaño que no suele superar los 2 cm. Su etiología es desconocida, pero se han implicado factores traumáticos, higiénicos y hormonales. (12-14).

A. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS HORMONAS SEXUALES FEMENINAS

Se denominan hormonas sexuales a las producidas por el ovario (o el testículo) y cuyas acciones se manifiestan en el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios y en el proceso de la reproducción (15). Pertenecen a una subclase de lípidos denominados genéricamente esteroides, que se caracterizan por tener una estructura básica común, el ciclopentano-perhidrofenantreno, que está formado por tres anillos bencénicos (A, B, C), constituidos cada uno por seis átomos de carbono y un anillo ciclopentano (D), formado por cinco átomos de carbono.

Existen tres grandes grupos de esteroides sexuales, que se diferencian entre sí por poseer cada uno un número específico de átomos de carbono:

- Con 18 átomos de carbono: el estrano, del cual derivan los estrógenos (Figura 1).
- Con 19 átomos de carbono: el androstano, del que derivan los andrógenos (Figura 2).
- Con 21 átomos de carbono: el pregnano. Derivan de él los gestágenos (Figura 3).

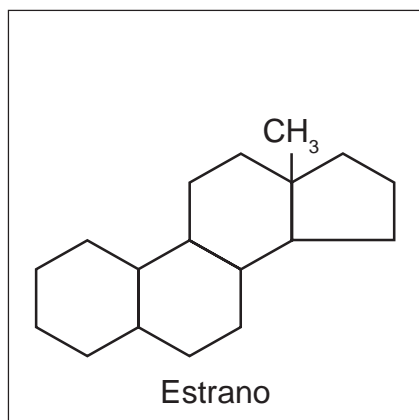


Figura 1: Estructura química del estrano. Tomada de Usandizaga (27)

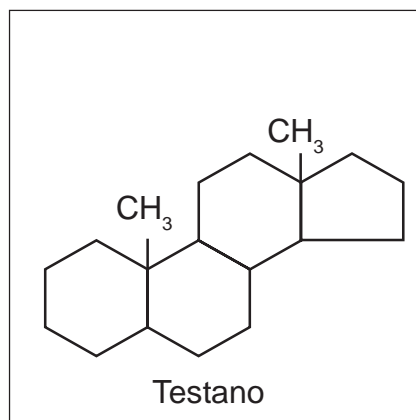


Figura 2: Estructura química del androstano. Tomada de Usandizaga (27).

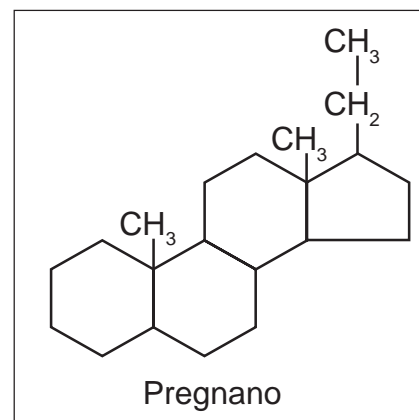


Figura 3: Estructura química del pregnano. Tomada de Usandizaga (27).

ESTRÓGENOS

La denominación dada a estas hormonas procede de su capacidad para provocar el estro o período de celo en las hembras de los mamíferos. Además de los 18 átomos de carbono, poseen un anillo aromático (tres dobles enlaces) en el anillo A y un grupo hidróxilo en C-3. Los estrógenos más importantes fisiológicamente producidos en el ovario son el estradiol y la estrona. Existe un tercer estrógeno natural, el **estriol**, de muy baja potencia como estrógeno, pero de elevada producción en caso de embarazo.

El **estradiol** es el estrógeno que segrega el ovario en mayor cantidad y el de mayor potencia biológica (Figura 4). La producción diaria de estradiol varía según la fase del ciclo ovárico, con cifras de 30 a 50 mg/día (70-100 pg/ml) en la fase folicular precoz, 300 a 500 mg/día (220-400 pg/ml) en la fase preovulatoria y 200 a 350 mg/día (150-250 pg/ml) en la fase lútea. Tan ínfimas cantidades dan idea de su extremada potencia biológica, sobre todo al considerar que sólo una pequeña cantidad circula libre en sangre.

La **estrona** es el principal estrógeno posmenopáusico. Es menos potente que el estradiol y no presenta cambios cíclicos.

Los estrógenos son los responsables de la aparición y mantenimiento de los caracteres sexuales primarios durante la etapa puberal. Además, a corto plazo, son responsables directos de todas las transformaciones cíclicas que tienen lugar durante la fase folicular, en especial el grosor del endometrio y el moco cervical. También desarrollan su acción sobre el hipotálamo, la

hipófisis, el tiroides y la glándula suprarrenal. Son importantes en el mantenimiento del sistema simpático y parasimpático, intervienen en el equilibrio hidrosalino (retención de sodio y agua), en el metabolismo del calcio y del fósforo (limitando la reabsorción ósea), en el metabolismo hidrocarbonado y lipídico, actúan sobre la circulación y coagulación sanguínea y mantienen el trofismo de la piel femenina (8, 15, 16).

GESTÁGENOS O PROGESTÁGENOS

Los principales gestágenos producidos en el ovario son la pregnenolona y la progesterona. La **pregnenolona** es un precursor de todos los esteroides sintetizados en el ovario. La **progesterona** es producida en grandes cantidades por el cuerpo lúteo y la placenta (25 mg/día; 8-30 ng/ml) (Figura 5). Posee una actividad biológica pequeña, lo que, unido a que tiene una vida media muy corta, justifica la presencia de tan grandes cantidades de esta hormona para ejercer su efecto. Su misión fundamental es la protección del embarazo en sus fases iniciales. Tiene también una acción termogénica importante, al producir una elevación de la temperatura en medio grado en la fase lútea del ciclo; una acción metabólica (retención de agua y sodio) y actúa sobre el crecimiento y el trofismo de la mama en colaboración con los estrógenos (15, 16).

B. CICLO GENTAL FEMENINO

Se entiende por ciclo genital femenino a la serie de fenómenos anatomofisiológicos que, desde la pubertad hasta la menopausia, se repiten periódica y regu-

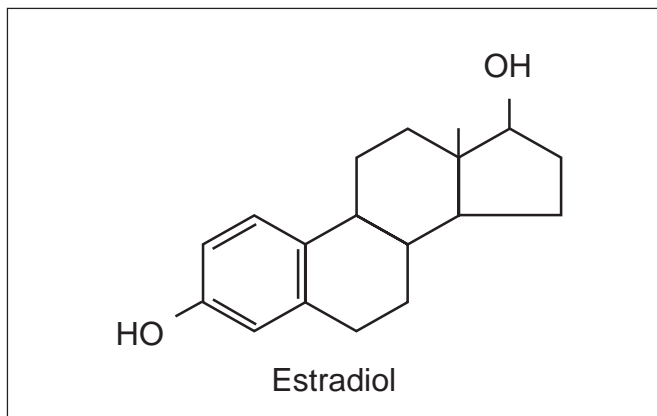


Figura 4: Estructura química del estradiol. Tomada de Usandizaga (27).

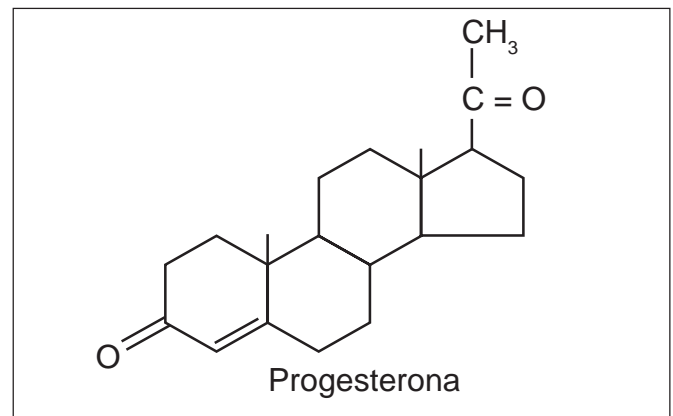


Figura 5: Fórmula química de la progesterona. Tomada de Usandizaga (27)

larmente en el organismo de la mujer, muy especialmente en su aparato genital. Este proceso se repite de forma regular durante toda la etapa de madurez sexual, estando regido por estructuras superiores en el hipotálamo y la hipófisis.

El fenómeno fundamental del ciclo es la ovulación, que tiene lugar en el ovario. Tiene una función doble: liberar células germinales capaces de ser fecundadas y secretar hormonas que van a tener una amplia repercusión en todo el organismo.

La formación de los estrógenos en los ovarios comienza entre la octava y la décima semana de gestación del feto, y las oogonias se transforman en oocitos primarios entre las semanas diez y once. Un número finito de estas células germinales se concentra en el ovario con un máximo de siete millones de oocitos entre el quinto y el sexto mes de gestación. Posteriormente, a través del proceso de atresia, las células germinales decrecen en número hasta alcanzar el millón de folículos primordiales conteniendo un único óvulo cada uno en el momento del nacimiento. La mayoría de estos folículos no alcanzan su desarrollo, llegando a la pubertad unos 400.000. Será en este momento cuando la maduración final de estas células comience (8).

El **ciclo ovárico** puede ser dividido en dos fases: maduración folicular y fase de cuerpo lúteo (8,15-17) (Figura 6).

1. FASE DE MADURACIÓN FOLICULAR

El primer signo del inicio del desarrollo folicular es la transformación de las células planas que rodean al oocito en células cúbicas, que proliferarán para dar lugar a un estrato denominado membrana granulosa. Por fuera de esta membrana las células del estroma ovárico inician una diferenciación, aumentan su volumen y su vascularización para formar la teca interna. Esta estructura se denomina **folículo primario o preantral**.

Entre las células de la granulosa comienzan a aparecer pequeñas vacuolas, que, al confluir, pasan a formar una cavidad llena de líquido transparente denominada antro folicular o cavidad antral, pasando a ser **folículos secundarios o antrales**.

La mayoría de estos folículos van a sufrir un proceso degenerativo e involutivo (atresia), de tal manera que sólo uno de los folículos continua su crecimiento para

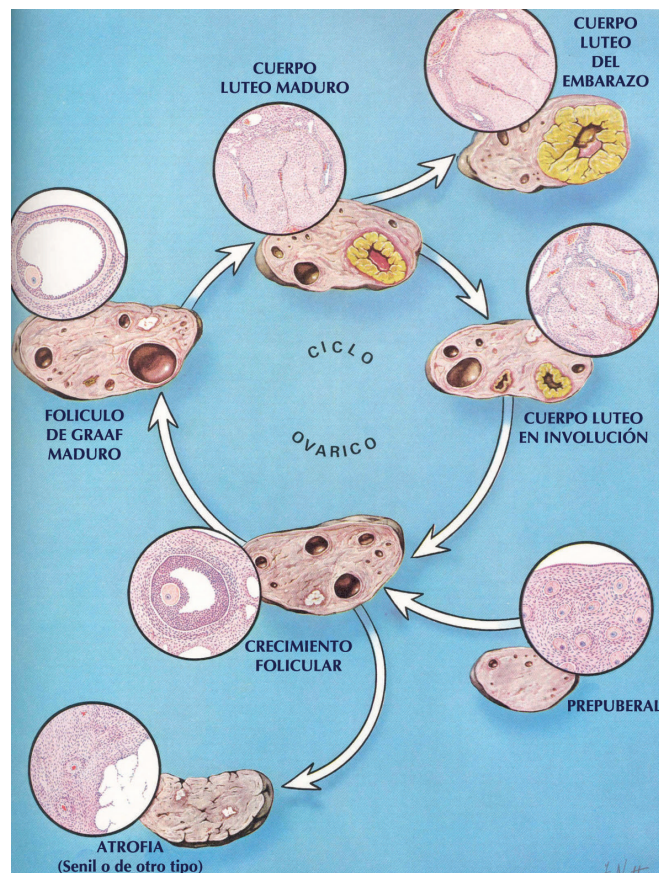


Figura 6: Fases del ciclo ovárico. Tomado de Netter (29).

convertirse en el **folículo dominante**. Éste agranda aún más su cavidad antral y va aproximándose a la superficie del ovario. Al final de su desarrollo alcanza un diámetro de 16 a 22 mm pasando a denominarse **folículo maduro, terciario, de De Graaf o folículo preovulatorio**.

Todo este proceso dura aproximadamente dos semanas. A partir de este momento se inician una serie de cambios que conducen a la ovulación. Se produce un despegamiento y salida del oocito de su zona de anclaje al folículo mediante la rotura folicular en su zona más prominente (estigma). Esto permite al oocito continuar su meiosis dando lugar a la formación de dos células: el oocito II y el primer corpúsculo polar. Tras la ovulación se produce el colapso de la cavidad folicular, que se arruga y repliega y aparecen abundantes focos de hemorragia desde los vasos de la teca que dan lugar a la formación de un coágulo hemático central y a un tapón de fibrina que cierra el estroma de la ovulación.

2. FASE DE CUERPO LÚTEO

Tiene una duración más constante (14 ± 2 días) y se divide en cuatro fases:

- Proliferación:** Las células de la granulosa y la teca sufren un proceso de diferenciación específica y se transforman en células luteínicas.
- Vascularización:** Se produce una gran proliferación de vasos invadiendo los espacios entre las células luteínicas.
- Florescencia:** Es la fase de máxima actividad endocrina del cuerpo lúteo, que aparece como una glándula de 17 a 20 mm de diámetro, de color amarillento. El culmen de su actividad se alcanza al octavo día de esta fase.
- Regresión o involución:** Si no se ha producido el embarazo, el cuerpo lúteo inicia su involución hacia el décimo día de la ovulación. Se produce una intensa infiltración por leucocitos y macrófagos, lo que implica una brusca liberación de radicales de oxígeno que, junto a otras citoquinas y factores inhibidores del crecimiento lleva a una rápida involución de la glándula. Posteriormente, todo lo que era cuerpo lúteo queda sustituido por tejido conectivo que permanece en el ovario como una cicatriz fibrosa llamada el **corpus albicans**.

REGULACIÓN NEUROHORMONAL DEL CICLO FEMENINO (Figura 7)

El hipotálamo es el órgano central ordenador del ritmo cíclico y cumple las funciones de "reloj biológico". Por medio de la liberación del factor liberador de gonadotropina (GnRH) provoca la liberación de gonadotropinas que actúan sobre el ovario.

Las hormonas gonadotropas son dos: la FSH u hormona estimulante de los folículos y la LH u hormona luteinizante. La FSH ejerce su acción sobre las células de la granulosa en el ovario, al mismo tiempo que estimula el crecimiento de las células germinales. La LH actúa sobre las células intersticiales y estromales promoviendo la síntesis de esteroides. Al mismo tiempo tiene una actividad fundamental en el desencadenamiento de la ovulación.

Normalmente, el primer día de hemorragia menstrual se designa como día uno del ciclo. En este momento la producción de estrógenos es baja, y la producción de FSH es máxima. Como resultado de la acción de la FSH varios folículos inician su crecimiento, aumentando los

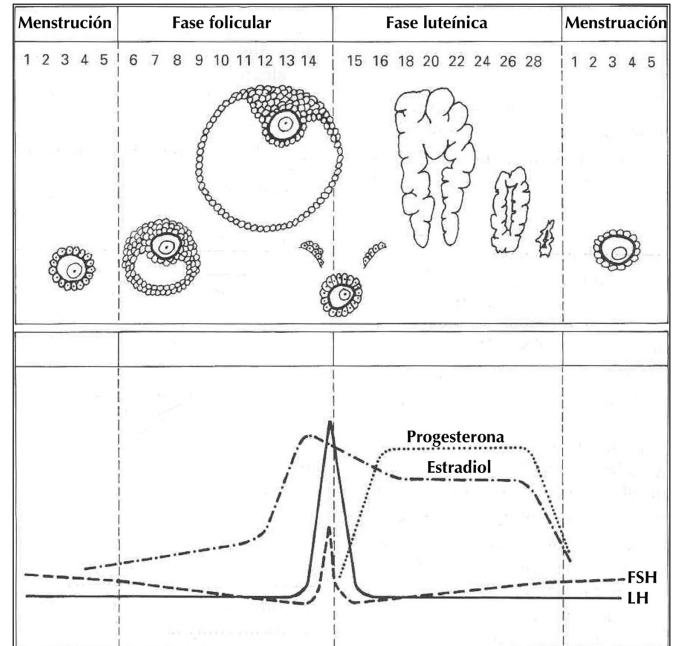


Figura 7: El ciclo ovárico en el panel superior. En el panel inferior se representan los niveles de hormonas gonadotropas y ováricas durante el ciclo. Tomada de Usandizaga (27).

niveles de estrógenos al cabo de 4 o 5 días. Durante la primera mitad del ciclo, la secreción de FSH disminuye, al tiempo que aumenta la producción de estrógenos. Esta fase estrogénica da lugar también a un aumento en la producción de LH, y, al parecer, desencadena los mecanismos endocrinos que originan la ovulación del folículo maduro en el día 14.

Después de la ovulación los niveles de estrógenos disminuyen ligeramente durante varios días. No es raro que en estos momentos aparezca una ligera hemorragia de uno o dos días de duración.

En la segunda fase del ciclo aumenta con rapidez la producción de progesterona, cuyo efecto puede detectarse fácilmente a través de los cambios que sufre el endometrio en las 48 horas siguientes a la ovulación. En este punto, la secreción de LH disminuye. Al llegar el día 20, el nivel de estrógenos es parecido al existente antes de la ovulación y la progesterona se encuentra en su fase de máxima producción. A menos que se produzca la fecundación del ovocito y que este se implante en el endometrio, se produce una disminución en la secreción de estrógenos y progesterona, lo que produce una serie de alteraciones en el endometrio, que darán lugar a su necrosis y desprendimiento (17).

C. REGULACIÓN NEUROHORMONAL DEL EMBARAZO

El embarazo comienza cuando óvulo y espermatozoide se unen en la trompa. El huevo formado se traslada al útero para continuar su desarrollo hasta que el feto adquiera su capacidad para vivir en el exterior. En el caso de que se haya producido un embarazo el cuerpo lúteo no involucionará. Al decimocuarto día aumenta su tamaño y su función permanece hasta bien entrado el tercer mes de gestación. En estas circunstancias se denomina **cuerpo lúteo verdadero o de embarazo** (15).

El cuerpo lúteo del ovario secreta estrógenos y progesterona hasta el cuarto mes del embarazo en cantidades sólo ligeramente superiores a las que se producen después de la ovulación y en la segunda mitad del ciclo menstrual. Sin embargo, a partir del sexagésimo día de gestación, la placenta empieza a secretar estas hormonas en cantidades progresivamente elevadas, alcanzando un máximo al final del embarazo (17). Sin embargo, la placenta nunca llega a ser un órgano endocrino autónomo, ya que los esteroides producidos por ella proceden de precursores de esteroides que ingresan a través de la sangre materna o fetal.

En la biosíntesis de los **estrógenos** intervienen la madre, el feto y la placenta. La madre y el feto actúan como fuentes de precursores, que en la placenta son convertidos en estrógenos. Los niveles de estrógenos maternos a lo largo del embarazo alcanzarán unas concentraciones treinta veces superiores a las que se encuentran en la fase lútea.

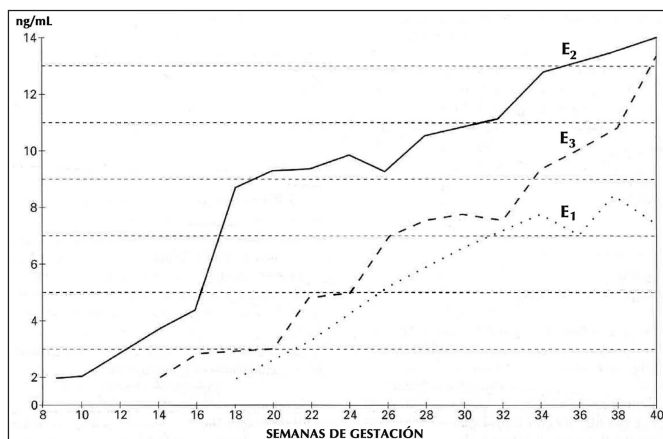


Figura 8: Variación de los niveles de estrógenos a lo largo del embarazo. E1: estrón; E2: estradiol; E3: estriol. Tomado de Usandizaga (27).

Poco después del parto la producción de estrógenos y progesterona se detiene, alcanzando valores comparables a los presentes en la mujer no embarazada (17) (Figura 8).

La **progesterona** se forma a través del colesterol materno. El 90% de la progesterona producida en la placenta pasa a la circulación materna y el 10% restante a la circulación fetal. Los niveles de progesterona a lo largo del embarazo aumentan progresivamente, alcanzando unas concentraciones diez veces superiores que las que se encuentran durante la fase lútea del ciclo genital. La concentración en la 27 semana de gestación es de 25 mg/ml (15) (Figura 9).

D. PAPEL DE LAS HORMONAS SEXUALES EN LA PATOGÉNESIS DE LA GINGIVITIS GRAVÍDICA

Aunque parece que, durante el embarazo, la susceptibilidad de los tejidos gingivales a la inflamación está relacionada con los cambios hormonales propios del mismo, el mecanismo exacto por el cual estas hormonas incrementan la inflamación gingival es desconocido. El cambio hormonal más significativo es el incremento en la producción de estrógeno y progesterona (5).

Estas hormonas ejercen su función mediante la unión a receptores intracelulares específicos que pertenecen a la superfamilia de factores de transcripción de ligandos activos que regulan el crecimiento celular, la

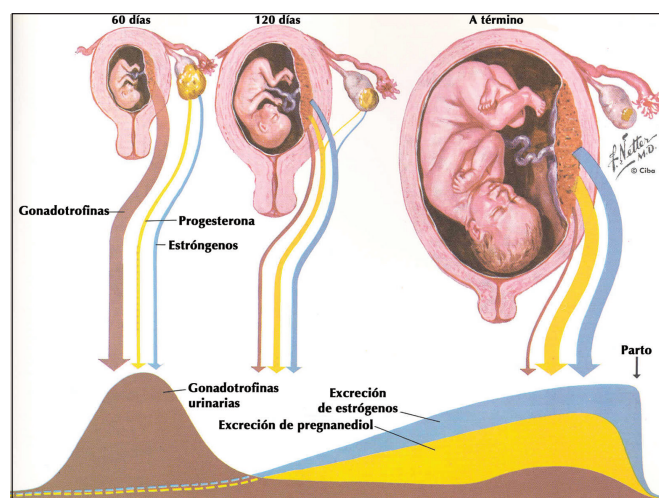


Figura 9: Variación de los niveles de estrógenos y progestágenos a lo largo del embarazo. Tomado de Netter (29).

diferenciación y el desarrollo (18). Los estudios de El-Attar (19,20) y Vittek (21) muestran que en el tejido gingival existen receptores para estrógenos y progesterona localizados en las capas basal y espinosa del epitelio gingival, en los fibroblastos del tejido conectivo y en las células endoteliales y pericitos de capilares de la lamina propia (6); Sin embargo, Parkar (18) realiza en 1996 un análisis mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y no encuentra receptores para estrógenos y andrógenos expresados en tejidos periodontales ni gingivales, de tal modo que concluye que cualquier efecto atribuido a estas hormonas es indirecto. Esto podría explicar los datos que obtiene O'Neil (22) en su estudio en el cual no encuentra una correlación entre los niveles de hormonas circulantes y el aumento en la inflamación gingival registrado durante el embarazo. De este modo, se atribuye el efecto a los metabolitos de la progesterona y el estrógeno degradados en la encía.

En cualquier caso la respuesta de los tejidos a las hormonas sexuales femeninas va a depender del tipo de hormona circulante, de la proporción de estrógeno/progesterona así como de la concentración tisular de la hormona (5). Sus efectos a nivel del tejido gingival son variados, y tienden a ser clasificados en cuatro grandes grupos: cambios vasculares, cambios celulares, cambios microbiológicos y cambios inmunológicos (6, 8, 10).

CAMBIOS VASCULARES

Los efectos de los esteroides a nivel vascular pueden servir para explicar la clínica de edema, eritema, sangrado e incremento de fluido crevicular gingival observada durante el embarazo. Se ha demostrado una correlación entre el aumento en el volumen del fluido crevicular gingival y unos niveles elevados de esteroides, lo que indica que las hormonas podrían alterar la permeabilidad del surco gingival (23).

Aunque a nivel general los estrógenos son las principales hormonas responsables de las alteraciones de los vasos sanguíneos en los tejidos diana de las mujeres, en el caso de la encía, parece que es la progesterona la principal responsable de los cambios vasculares. La progesterona induce la dilatación de los capilares gingivales; es responsable de la clínica de eritema y edema, del aumento del exudado capilar y la permeabilidad capilar. Todo ello debido a una acción directa sobre las células endoteliales, a variaciones en la síntesis de prostaglandinas y a la supresión de la respuesta celular asociada al embarazo (6, 8, 24).

CAMBIOS CELULARES

Un análisis de los cambios celulares asociados refleja una disminución en la queratinización del epitelio gingival, un aumento del glucógeno epitelial, una proliferación de los fibroblastos y un bloqueo en la degradación del colágeno así como una disminución en la polimerización de la capa basal. Todo ello conduce a una disminución en la barrera epitelial y por tanto a una mayor respuesta frente a los irritantes de la placa (6, 15, 24, 25).

CAMBIOS MICROBIOLÓGICOS

Por otro lado, tanto progesterona como estrógeno aumentan el metabolismo celular de los folatos lo que contribuye a determinados cambios microbiológicos (10, 24-26). Se ha demostrado un aumento en la proporción de bacterias anaerobias/aerobias durante el embarazo así como un aumento en la proporción de *Prevotella intermedia* (*Pi*) sobre otras especies. Esta bacteria se caracteriza por requerir vitamina K para su crecimiento, sin embargo, es capaz de crecer en un medio suplementado con progesterona y estradiol que actúan como factores de crecimiento (26). El aumento más significativo de *Pi* se registra en el segundo trimestre del embarazo al tiempo que se observa clínicamente un aumento de la gingivitis (6). Sin embargo en un estudio desarrollado por Jonsson y cols (27) en mujeres embarazadas con enfermedad periodontal encuentran que esta patología es clínicamente semejante a la que se presenta en las mujeres no embarazadas, no evidenciando que el aumento en la concentración de hormonas en la saliva se asocie a una progresión de la enfermedad, ni a un aumento de *Pi* en localizaciones con periodontitis.

CAMBIOS INMUNOLÓGICOS

En cuanto a los cambios inmunológicos se ha observado una reducción en la respuesta inmune celular durante el embarazo probablemente para evitar un rechazo del cuerpo de la madre hacia el feto (28). Tanto el número como el porcentaje de linfocito *T-helper* (*Th*) disminuyen durante el embarazo y sólo se normalizan el tercer mes tras el parto. Dichos linfocitos son importantes moduladores de la respuesta inmune ya que son una fuente importante de citoquinas. Producen dos tipos funcionalmente diferentes: las citoquinas Th-1, encargadas de la respuesta proinflamatoria (respuesta celular), y las citoquinas Th-2 con propieda-

des antiinflamatorias (respuesta humoral). Durante el embarazo la respuesta inmune está desviada hacia la secreción de citoquinas Th-2. Las células B y los monocitos sólo aumentan ligeramente, alcanzando el máximo en el momento de parto. Hay una disminución de la quimiotaxis de los neutrófilos y la fagocitosis (5, 6, 29, 30). Miyagi y cols (31) encuentran que la progesterona induce la quimiotaxis de los polimorfonucleares, mientras que el estradiol la reduce.

Se ha sugerido que la progesterona puede funcionar como un inmunosupresor en los tejidos periodontales de la mujer embarazada, evitando la aparición de una respuesta inflamatoria aguda frente al estímulo de la placa bacteriana. Esto daría lugar a la aparición de una reacción tisular crónica, con una apariencia clínica de inflamación exagerada (32).

Por ello, las reacciones inmunes locales en la encía, exacerbadas por las hormonas sexuales femeninas, pueden alterar la patogénesis de la lesión inflamatoria y con ello permitir respuestas gingivales exageradas durante el embarazo. Esta idea está soportada por el hecho de que se han identificado receptores para esteroides sexuales en componentes del sistema inmune. El-Attar (19, 20) descubrió que la adición de hormonas sexuales a un tejido gingival causaba un significativo incremento en la síntesis de Prostaglandina E_2 (PG- E_2). Teniendo en cuenta que la PG- E_2 es un potente mediador de la inflamación, este podría ser un mecanismo para explicar el papel de las hormonas sexuales en el incremento de la inflamación (33).

EVIDENCIA CIENTÍFICA

El incremento en la severidad de las alteraciones gingivales durante el embarazo parece estar relacionado con los cambios hormonales que ocurren durante ese periodo. El mecanismo patogénico que explica este efecto aun no es conocido con exactitud, pero las observaciones realizadas por diferentes autores a lo largo de la historia apuntan hacia los cambios producidos por las hormonas sexuales femeninas a nivel vascular, celular, microbiológico e inmunológico como principales responsables del mismo (5, 6, 8, 24).

Los primeros casos de respuestas gingivales exageradas durante el embarazo fueron descritos en el siglo XIX por Eiselt en 1840 y Pinard en 1877.

Los trabajos de Løe y Silness (9) (1963) muestran que los primeros signos clínicos aparecen en el segundo

mes de embarazo y continúan hasta el octavo mes, observando cierta mejoría en el último mes. Sus resultados reflejan mayor severidad de manifestaciones clínicas en el tercer y octavo mes, volviendo a la normalidad al segundo mes postparto. Encuentran que los mayores incrementos en los índices gingivales se producen en torno a los incisivos. De acuerdo con ellos, se encuentran las observaciones realizadas por Raber-Durlacher (34) (1994) quien obtiene mayores valores de inflamación y sondaje en la zona anterior.

Cohen y cols (35, 36) (1969, 1971) y Samant y cols (37) (1976), encuentran por contra, que los mayores cambios en el índice gingival se producen tanto en el primero (35-37) como en el segundo trimestre del embarazo (35, 36), hallando mayores valores de inflamación en la mandíbula que el maxilar (35-37).

Rateitschak (38) (1967) encuentra valores de movilidad dental más pronunciados durante el embarazo que tras el parto, por lo que afirma que existe una influencia de las hormonas sexuales femeninas en la membrana periodontal. Sin embargo, Hugoson (23) (1970) y Lundgren y Lindhe (39) (1971), demuestran que el agravamiento de la gingivitis durante el embarazo no supone daños permanentes en las porciones más profundas del periodonto, por lo que sugieren que el incremento en la movilidad dental observado por Rateitschak no se debe a una pérdida de soporte óseo sino a cambios cualitativos en el ligamento periodontal.

Uno de los primeros estudios que sugiere una correlación entre el nivel de hormonas y la severidad de la gingivitis es el de Ziskin y col (40) (1933). Desde entonces múltiples estudios han comprobado esta evidencia y han establecido una etiología multifactorial en relación con el sistema endocrino para poder explicar estos cambios.

Ziskin y col. (1933) (40), Nutlay y col. (41) (1954) y Shkalr y col. (42) (1956) afirman que existen múltiples efectos histológicos visibles en el epitelio y conectivo gingival tras administrar hormonas sexuales en animales ovariectomizados. Por el contrario, Litwack y col. (43) (1970), Rubright y col. (44) (1971) y Hugoson y Lindhe (45, 46) (1971) no observan dichos efectos.

Turesky y col. (47) (1958) postulan que las hormonas sexuales actúan directamente sobre la encía, mientras que Løe y Silness (9) (1963) sugieren que la función de las hormonas sexuales es modificar la respuesta inflamatoria de la encía a los irritantes locales.

Lindhe y cols (48) (1967) en un estudio experimental en hámster analizan los efectos de las hormonas sobre el sistema vascular comprobando que estas inducen un impedimento vascular, por lo que concluyen que la gingivitis del embarazo puede ser considerada como una reacción tisular en la que las hormonas sexuales actúan sobre el tejido y el sistema vascular disminuyendo el nivel umbral a partir del cual distintos agentes son capaces de inducir daño tisular gingival. Este mismo autor (49, 50), en 1968, estudia la influencia de las hormonas sexuales en la exudación gingival en perros hembra con y sin gingivitis. En ambos casos se produce un incremento del volumen de fluido crevicular gingival que se recupera una vez que cesa la administración de hormonas, lo que explican por un aumento de la permeabilidad de los vasos dentogingivales.

El-Attar y cols (19, 20) (1973, 1974) en un estudio de experimentación animal proponen que la hiperactividad de los sistemas enzimáticos esteroideos específicos y la acumulación de sus metabolitos en la encía puede ser un factor influyente en la etiología de la gingivitis gravídica.

Recientemente se ha aceptado una nueva clasificación de las enfermedades periodontales dentro de las que se incluyen las enfermedades gingivales asociadas al embarazo (gingivitis gravídica y granuloma piogénico) como una patología inducida por placa y modificada por factores sistémicos (*International Workshop Classification for Periodontal Diseases*, 1999) (51). Se establece que las hormonas sexuales no son necesarias ni suficientes para producir cambios gingivales por sí mismas, sin embargo son capaces de alterar la respuesta de los tejidos gingivales a la placa dental y de esta forma contribuir indirectamente al desarrollo de la enfermedad periodontal.

APLICACIÓN PRÁCTICA: UTILIDAD DE LA SALIVA COMO MEDIO DIAGNÓSTICO

La saliva constituye una muestra biológica de fácil obtención (no invasiva), de bajo coste e indolora, cuya composición puede reflejar en gran medida ciertos acontecimientos de manifestación sistémica. La Academia de Ciencias de Nueva York, el Instituto Nacional de Investigación Dental de Estados Unidos y numerosos grupos de investigación sobre saliva han apoyado y recomiendan maximizar el potencial de este fluido para su uso en investigación, con el fin de facilitar el

diagnóstico y monitorizar el estado de salud general y bucodental de la población general (52, 53).

En los años ochenta se demostró que la saliva contenía hormonas (54-56). Los estudios han permitido establecer que el nivel de una hormona en saliva se correlaciona con el nivel libre de esa hormona en sangre (57). Las hormonas esteroideas en saliva son excepcionalmente estables y pueden ser medidas exactamente. En muchos estudios las concentraciones de estradiol y progesterona fueron medidas mediante radioinmunoanálisis en saliva, utilizando estos datos como indicador importante de la fecundidad.

La determinación de las concentraciones salivales de progesterona se ha utilizado extensamente puesto que proporciona un medio de determinación de la función ovárica durante el ciclo y el embarazo temprano. Los estudios encuentran correlaciones significativamente altas entre la progesterona total y libre en plasma y la progesterona salival (54, 58, 59).

Los niveles de estradiol en saliva se pueden utilizar para determinar la dinámica folicular, sin embargo existen limitaciones metodológicas a la hora de analizarlos, lo que hace que su uso esté menos extendido (55, 60).

El papel de las hormonas en el desarrollo de alteraciones gingivales durante el embarazo ha sido estudiado por diferentes autores, encontrando resultados contradictorios entre algunos de ellos. O'Neil (22) realiza un estudio con 26 mujeres embarazadas (semana 14-30 de gestación) y no encuentra una relación directa entre las concentraciones de progesterona y estradiol medidas en plasma y los valores de índice gingival, por lo que propone un efecto indirecto de los metabolitos sobre el tejido gingival.

Estos resultados están de acuerdo con los presentados por Muramatsu y cols (61), que, estudian a un grupo de 19 mujeres embarazadas, 12 mujeres no embarazadas y 8 mujeres en el quinto mes tras el parto. Analizan 1 ml de saliva de parótida estimulada y analizan las concentraciones de estradiol y progesterona mediante radioinmunoanálisis. Obtienen unos valores de progesterona de 0,13 ng/ml en el primer trimestre y 0,24 ng/ml en el segundo. Sin embargo no consiguen establecer una correlación entre ellas y el grado de inflamación gingival.

Jonsson y cols (27) (1988) en un estudio con embarazadas con enfermedad periodontal previa no encuen-

tran correlación entre los parámetros clínicos y los niveles de esteroides en saliva.

Por otro lado Vittek y cols (21) sí que encuentran una relación entre la concentración de esteroides en saliva y un incremento en la incidencia de enfermedad periodontal. Sin embargo los sujetos de su estudio poseen periodontitis avanzada. Zaki y cols (62) realizan un estudio con 30 embarazadas (10 en cada trimestre del embarazo) y 10 mujeres no embarazadas en la fase lútea (17-21 días del ciclo) en el que valoran las concentraciones de progesterona y 17 β -estradiol en muestras de saliva no estimulada mediante radioinmunoanálisis. Obtienen valores de progesterona de 220-280 pg/ml para el primer trimestre y 460-1590 pg/ml para el segundo trimestre. Al mismo tiempo encuentran un incremento en la severidad de la inflamación gingival según avanza el embarazo, por lo que concluyen que el aumento de la concentración de hormonas en saliva es un factor etiológico importante de la alteración gingival asociada al embarazo.

CONCLUSIONES

1. Durante el embarazo se produce una alteración en los niveles de hormonas sexuales femeninas que conlleva la aparición de manifestaciones sistémicas propias del mismo.
2. Los cambios hormonales asociados al embarazo parecen ser los responsables del desarrollo de la gingivitis gravídica, aunque el mecanismo patogénico responsable aun es desconocido.
3. A lo largo de la historia diferentes autores han tratado de encontrar una correlación entre los cambios en los niveles de hormonas sexuales femeninas y el desarrollo de alteraciones gíngivo-periodontales; sin embargo los resultados obtenidos son contradictorios.
4. El empleo de la saliva como medio diagnóstico ha facilitado el estudio de los niveles hormonales de las pacientes embarazadas.
5. Son necesarios más estudios que determinen el papel exacto de las hormonas sexuales femeninas en los tejidos gíngivo-periodontales.

ABSTRACT

Pregnancy gingivitis is a proliferative, vascular and non-specific inflammation accompanied by a wide cellular inflammatory infiltrate. Clinically it is characterized by an increased gingival redness and

bleeding on probing index, gingival margin augmentation and hyperplasia of the interdental papillae. It is extremely common and affects 30-100% of all pregnant women.

Even though it seems that during pregnancy susceptibility of gingival tissues to inflammation is related to altered hormonal levels, the exact mechanism by which they exert their effects remain unknown. The most significant hormonal change is the increase in the production of estrogens and progesterone.

Tissue's response to female sex hormones depends on the circulating hormone type, the estrogens/progesterone ratio and on the tissular concentration of the hormone. Their effects on the gingival tissues are diverse and tend to be classified into four main groups: vascular, cellular, microbiological and immunological changes.

KEY WORDS

Gingivitis. Pregnancy. Pyogenic granuloma. Estrogens. Progesterone. Pathogenesis. Diagnosis. Pregnancy gingivitis.

BIBLIOGRAFÍA

1. Grau DM, Silvestre FJ, Miralles L, Roig JM. La secreción salival durante el embarazo. *Rev Eur Odontoestomatol* 2002;XIV(2):93-8.
2. Arafat AH. Periodontal status during pregnancy. *J Periodontol* 1974;45(8):641-3.
3. Chaikin BS. Incidence of gingivitis in pregnancy. *Quintessence International* 1977;8(10):81-9.
4. Conde Vidal J, Inglés Castillo M, Purificación Roldán G. Enfermedad parodontal en el embarazo. *Revista Española de Estomatología* 1981;29(3):179-90.
5. Laine MA. Effect of pregnancy on periodontal and dental health. *Acta Odontol Scand* 2002; 60:257-64.
6. Garrido de Cab N, Blanco Carrión J, Ramos Barbosa I. Enfermedad periodontal y embarazo. *Periodoncia* 1999;9(1):31-40.
7. Gaffield ML, Colley Gilbert BJ, Malvitz DM, Romaguera R. Oral health during pregnancy. An analysis of

- information collected by the Pregnancy Risk Assessment Monitoring System. *JADA* 2001;132:1009-16.
8. Mealy BL, Moritz, AL. Hormonal influences: effects of diabetes mellitus and endogenous female sex steroid hormones on the periodontium. *Periodontology* 2000 2003;32:59-81.
9. Loe H & Silness J. Periodontal disease in pregnancy: prevalence and severity. *Acta Odontologica Scandinavica* 1963;21:533-51.
10. Zachariassen RD. The effect of elevated ovarian hormones on periodontal health: oral contraceptives and pregnancy. *Women & Health* 1993;20(2):21-30.
11. Bascones A, Llanes F. *Medicina Bucal*. Tomo I. 2ª Edición. Avances ed. Madrid, 1991: 274.
12. Ojanotko-Harri AO, Harri M-P, Hurttia HM, Sewon LA. Altered tissue metabolism of progesterone in pregnancy gingivitis and granuloma. *J Clin Periodontol* 1991;18:262-6.
13. Yuan K, Wing LC, Lin M. Pathogenetic roles of angiogenic factors in pyogenic granulomas in pregnancy are modulated by female sex hormones. *J Periodontol* 2002;73:701-8.
14. Silverstein LH, Burton C, Garnick J, Singh B. The late development of oral pyogenic granuloma as a complication of pregnancy: a case report. *Compendium* 1996;17(2):192-8.
15. Usandizaga JA, De la Fuente P. *Tratado de obstetricia y Ginecología*. Volumen I. Ed McGraw-Hill. Interamericana. Madrid, 1997.
16. González- Merlo J, González Bosquet J, González Bosquet E. *Ginecología*. Ed Masson. 8ª edición. Barcelona, 2003.
17. Netter FH. *Sistema reproductor*. Tomo 2. Ed Salvat. Barcelona, 1990.
18. Parkar MH, Newman HN, Olsen I. Polymerase chain reaction analysis of oestrogen and androgen receptor expression in human gingival and periodontal tissue. *Archs oral Biol* 1996;41(10):979-83.
19. El Attar TMA, Hugoson A. Comparative metabolism of female sex steroids in normal and chronically inflamed gingiva of the dog. *J Periodontal Res* 1973;9(5):284-9.
20. El Attar TMA, Roth GD, Hugoson A. Comparative metabolism of 4-¹⁴C-progesterone in normal and chronically inflamed human gingival tissue. *J Periodont Res* 1973;8(2):79-85.
21. Vittek J, Rappaport SC, Gordon GG, Munnangi PR, Southren AL. Concentration hormones and metabolism of androgens by human gingiva. *J Periodontol* 1979;50(5):254-64.
22. O'Neil TCA. Plasma female sex-hormone levels and gingivitis in pregnancy. *J Periodontol* 1979;50(6):279-82.
23. Hugoson A. Gingival inflammation and female sex hormones. *J Periodont Res* 1970;5(suppl):1-18.
24. Sooriyamoorthy M, Gower DB. Hormonal influences on gingival tissue: relationship to periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1989;16:201-8.
25. Deasy MJ, Grota LJ, Kennedy JE. The effect of estrogen, progesterone and cortisol on gingival inflammation. *J Periodont Res* 1972;7:111-24.
26. Kornman K, Loesche W. The subgingival microbial flora during pregnancy. *J Period Res* 1980;15:111-22.
27. Jonsson R, Howland BE, Bowden GHW. Relationship between periodontal health, salivary steroids and *Bacteroides intermedius* in males, pregnant and non-pregnant women. *J Dent Res* 1988;67(8):1062-9.
28. O'Neil TCA. Maternal T-Lymphocyte response and gingivitis in pregnancy. *J Periodontol* 1979;50(4):178-84.
29. Raber-Durlacher JE, Zeijlemaker WP, Meinesz AAP, Abraham-Inpijn L. CD4 to CD8 ratio and in vitro lymphoproliferation responses during experimental gingivitis in pregnancy and post-partum. *J Periodontol* 1991;62:663-7.
30. Heasman PA, Collins JG, Offenbacher S. Changes in crevicular fluid levels of interleukin-1b, leukotriene B₄, prostaglandin E₂, thromboxane B₂ and tumor necrosis factor a in experimental gingivitis in humans. *J Periodont Res* 1993;28:241-7.
31. Miyagi M, Morishita M, Iwamoto Y. Effects of sex hormones on production of prostaglandin E₂ by human peripheral monocytes. *J Periodontol* 1993;64:1075-8.
32. Tilakaratne A, Soory M. Effects of the anti-androgen finasteride on 5a-reduction of androgens in the presence of progesterone in human gingival fibroblasts:

- modulatory actions of the alkaline phosphatase inhibitor levamisole. *J Periodont Res* 2000; 35:179-85.
33. Yaldin F, Basegmez C, Gulden I, Berber L, Eskinazi E, Soyidine M. et al. The effects of periodontal therapy on intracrevicular prostaglandin E_2 concentrations and clinical parameters in pregnancy. *J Periodontol* 2002;73:173-7.
34. Raber-Durlacher JE, Van Steenberghe TJM, Van der Velden U, de Graaff J, Abraham-Inpijn L. Experimental gingivitis during pregnancy and post-partum: clinical, endocrinological, and microbiological aspects. *J Clin Periodontol* 1994;21:549-58.
35. Cohen W, Friedman L, Shapiro J, Kyle GC. A longitudinal investigation of the periodontal changes during pregnancy. *J Periodontol* 1969;40:563-70.
36. Cohen W, Friedman L, Shapiro J, Kyle GC, Franklin S. A longitudinal investigation of the periodontal changes during pregnancy and fifteen months post-partum. Part II. *J Periodontol* 1971;42(10):653-7.
37. Samant A, Malik CP, Chabra SK, Devi PK. Gingivitis and periodontal disease in pregnancy. *J Periodontol* 1976;47(7):415-8.
38. Rateitschak KH. Tooth mobility changes in pregnancy. *J Periodontal Res* 1967;2(3):199-206.
39. Lundgren D, Lindhe J. Lack of influence of female sex hormones on alveolar bone loss in hamsters. *Scand J Dent Res* 1971;79:113-8.
40. Ziskin DE, Blackberg SN, Stout AP. The gingiva during pregnancy. AN experimental study and a histopathological interpretation. *Surg Gynecol Obstet* 1933;57:719.
41. Nutlay AG, Bhaskar SN, Weinmann JP, Budy AM. The effect of estrogen on the gingival and alveolar bone of molars in rats and mice. *J Dent Res* 1954;33(1):115-27.
42. Shkalr G, Glickman I. The effect of estrogenic hormone on the periodontium of white mice. *J Periodont* 1956; 27:16-23.
43. Litwack D, Kennedy JE, Zander HA. Response of oral epithelia to ovariectomy and estrogen replacement. *J Periodontal Res* 1970;5(4):263-8.
44. Rubright WC, Higa LH, Yannone ME. Histological quantification of the biological effects of estradiol benzoate on the gingival and genital mucosa of castrated rabbits. *J Periodontal Res* 1971;6(1):55-64.
45. Hugoson A & Lindhe J. Gingival tissue regeneration in female dogs treated with sex hormones. Histological observations. *Odontol Revy* 1971;22(4):425-39.
46. Hugoson A & Lindhe J. Gingival tissue regeneration in female dogs treated with sex hormones. Clinical observations. *Odontol Revy* 1971;22(3):237-49.
47. Turesky S, Fisher B, Glickman I. A histochemical study of the attached gingival in pregnancy. *J Dent Res* 1958;37(6):1115-22.
48. Lindhe J, Branemark PI. Changes in microcirculation after local application of sex hormones. *J Periodont Res* 1967;2:185-93.
49. Lindhe J, Attstrom R, Björn A. Influence of sex hormones on gingival exudation in gingivitis-free female dogs. *J Periodont Res* 1968;3:273-8.
50. Lindhe J, Attstrom R, Björn A. Influence of sex hormones on gingival exudation in dogs with chronic gingivitis. *J Periodont Res* 1968;3:279-83.
51. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999;4:1-6.
52. Medina M, Merino LA, Gorodner JO. Utilidad de la saliva como fluido diagnóstico en http://www.webodontologica.com/odon_arti_uti_saliv.asp.
53. Riad-Fahmy D, Read GF, Walker RF, Griffiths K. Steroids in saliva for assessing endocrine function. *Endocrine Rev* 1982;3:367-95.
54. Sufi SB, Donaldson A, Gandy SC, Jeffcoat SL, Chearskul S, Gon H et al. Multicenter evaluation of assays for estradiol and progesterone in saliva. *Clin Chem* 1985;31(1):101-3.
55. Belkien LD, Bordt J, Moller P, Hano R, Nieschlag E. Estradiol in saliva for monitoring follicular stimulation in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 1985;44(3):322-7.
56. Berthonneau J, Begon F, Bounaud JY, Chansigaud JP, Cedard L. Evolution of salivary estradiol levels during the spontaneous menstrual cycle. Correlation between saliva and plasma. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 1989;18(1):47-52.

57. Marek B, Kot T, Bunter B. Usefulness of measuring the levels of estrogens and progesterone in the saliva during pregnancy. *Ginekol Pol* 1989; 60(5):291-4.
58. Wong YF, Mao K, Panesar NS, Loong EP, Chang AM, Mi ZJ. Salivary estradiol and progesterone during the normal ovulatory menstrual cycle in Chinese women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1990;34(1-2):129-35.
59. Meulenberg EP, Hofman JA. The effect of pretreatment of saliva on steroid hormone concentrations. *J Clin Chem Clin Biochem* 1990;28(12):923-8.
60. Worthman CM, Stallings JF, Hofman LF. Sensitive salivary estradiol assay for monitoring ovarian function. *Clin Chem* 1990;36(10):1769-73.
61. Muramatsu Y, Takaesu Y. Oral health status related to subgingival bacterial flora and sex hormones in saliva during pregnancy. *Bull Tokyo dent Coll* 1994;35(3):139-51.
62. Zaki H, RI Hak R, Amer W, Saleh F, El Faras A, Ragab L et al. Salivary female sex hormone levels and gingivitis in pregnancy. *Biomed Biochim Acta* 1984;43(6):749-54.



Gingival changes during pregnancy (I): Influence of hormonal variations on clinical and immunological parameters.

Journal:	<i>Journal of Clinical Periodontology</i>
Manuscript ID:	CPE-06-09-2089.R2
Manuscript Type:	Original Article Clinical Periodontology
Date Submitted by the Author:	
Complete List of Authors:	Figuero, Elena; Complutense University, Periodontology Carrillo-de-Albornoz, Ana; Complutense University, Periodontology Herrera, David; University Complutense, Periodontics Bascones-Martinez, Antonio; Complutense University, Periodontology; Facultad de Odontología, Medicina y Cirugía Bucofacial
Topic:	Aetiology
Keywords:	Gingivitis, Pregnancy gingivitis, Interleukin-1 β (IL-1 β), Prostaglandin E2 (PGE2), Hormones
Main Methodology:	Other



ORIGINAL RESEARCH ARTICLE: CLINICAL PERIODONTOLOGY

Title: Gingival changes during pregnancy (I): Influence of hormonal variations on clinical and immunological parameters.

Running title: Gingival changes during pregnancy.

Authors: Figuero, Elena; Carrillo-de-Albornoz, Ana; Herrera, David; Bascones-Martínez, Antonio.

Key words: Pregnancy gingivitis, interleukin-1 β (IL-1 β), prostaglandin E2 (PGE2), hormones, progesterone, estradiol, plaque index, gingival index, post-partum, saliva.

Institution

Department of Periodontology, School of Dentistry, Complutense University of Madrid, Spain.

Corresponding author

ELENA FIGUERO

Address: Departamento de Estomatología III. Facultad de Odontología. Universidad Complutense de Madrid. Plaza Ramón y Cajal S/N. 28040. Madrid. Spain.

Telephone Number: (+34) 913941934.

Fax number: (+34) 913941910

E-mail address: efigueruiz@gmail.com

SOURCE OF FUNDING

This research was partially supported by two grants: one from the Education Ministry of Spain (AP2002-3116) and another from the Autonomous Community of Madrid.

Dentaid freely supplied toothbrushes (Vitis access®, Dentaid, Sant Cugat del Vallés, Spain).

Colgate freely supplied dentifrices (Colgate Total®, Colgate, Piscataway, NJ, USA).

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that they have no conflict of interests.

ABSTRACT

Aim: To test whether exacerbated gingival inflammation in pregnancy is associated with increased salivary hormone levels and changes in gingival crevicular fluid (GCF) interleukin-1 β (IL-1 β) and prostaglandin-E2 (PGE2) levels.

Materials and methods: In this cohort study, forty-eight pregnant women without periodontitis were evaluated in the first, second and third trimesters and at three months postpartum. Twenty-eight non-periodontitis non-pregnant women were evaluated twice, with a six-month interval. Plaque and gingival indices (PII, GI), salivary progesterone and estradiol and GCF IL-1 β and PGE2 levels were determined.

ANOVA for repeated measures or Friedman's test were used for intragroup analyses. Inter-group comparisons were analysed with t-test or Mann Whitney U-test.

Correlations were evaluated with Pearson's and Spearman's test.

Results: Pregnant women showed an increase in GI ($p<0.05$) despite maintaining low PII values. No changes in IL-1 β and PGE2 levels were observed during pregnancy. No significant correlation was found between the GI increase and salivary hormone levels. GI ($p<0.05$) and IL-1 β levels ($p<0.001$) were lower in non-pregnant than in pregnant women.

Conclusions: This study confirms the presence of an exacerbated gingival inflammation during pregnancy, but this phenomenon could not be associated with an increase in progesterone or estradiol or with changes in PGE2 or IL-1 β .

CLINICAL RELEVANCE

Scientific rationale for the study: It has been hypothesized that the increase in gingival inflammation during pregnancy might be favoured by an alteration in the maternal immune system, but no prospective observational study has addressed this issue.

Principal findings: There was an increase in the gingival reactivity to plaque during pregnancy, which was more marked in anterior teeth. IL-1 β levels were higher in pregnant women but did not change during pregnancy. PGE2 levels were similar between pregnant and non-pregnant women.

Practical implications: Further studies are warranted to clarify the relevance of IL-1 β in pregnancy gingivitis.

Gingival changes during pregnancy (I): Influence of hormonal variations on clinical and immunological parameters.

Cross-sectional and longitudinal clinical studies have reported an increase during pregnancy in the prevalence and severity of gingival inflammation (Cohen et al. 1969, Gursoy et al. 2008, Hugoson 1970, Jonsson et al. 1988, Kinnby et al. 1996, Kornman & Loesche 1980, Loe & Silness 1963, Machuca et al. 1999, Miyazaki et al. 1991, O'Neil 1979b, Samant et al. 1976, Tilakaratne et al. 2000, Yalcin et al. 2002b), which disappears postpartum with no permanent effects on periodontal attachment (Cohen et al. 1971, Gursoy et al. 2008, Hugoson 1970, Loe & Silness 1963, Lundgren & Lindhe 1971, O'Neil 1979b, Tilakaratne et al. 2000). An experimental gingivitis study also revealed more swelling, redness and bleeding during pregnancy than after delivery (Raber-Durlacher et al. 1994).

According to the currently accepted classification of periodontal diseases, pregnancy gingivitis is a gingival disease induced by plaque and modified by systemic factors (Armitage 1999). Maier & Orban (1949) studied 53 biopsies from pregnant women with gingivitis and concluded that none of their findings were exclusively characteristic of gingivitis in pregnancy.

The prevalence of pregnancy gingivitis ranges from 36% (Maier & Orban 1949) to 100% (Loe & Silness 1963), although Chaikin (1977) found that it was developed by only 0.03% of women with excellent plaque control. Furthermore, the correlation between changes in hormone levels during pregnancy and the increase in gingival inflammation remains controversial (Jonsson et al. 1988, O'Neil 1979b, Samant et al. 1976).

The precise mechanism responsible for these gingival changes is unknown but various hypotheses have been proposed (Mascarenhas et al. 2003, Mealey & Moritz 2003, Sooriyamoorthy & Gower 1989), including depression of the immune system (Lopatin et al. 1980, O'Neil 1979a, Raber-Durlacher et al. 1993, Raber-Durlacher et al. 1991), increased vascularity and vascular flow (ElAttar & Hugoson 1974, Hugoson 1970, Lindhe & Attsfrom 1967, Lindhe & Branemark 1967, Lindhe et al. 1967), cellular changes (Mariotti 1994) and changes in oral biofilms (Jonsson et al. 1988, Kornman & Loesche 1980, Raber-

Durlacher et al. 1994). Hence, pregnancy gingivitis may be an exacerbated inflammatory response that results from a host-parasite imbalance (Kornman & Loesche 1980, Lopatin et al. 1980, Raber-Durlacher et al. 1993). However, it cannot be ruled out that the gingiva undergoes physiological changes during pregnancy, including an increased redness, oedema and greater bleeding tendency that clinically resemble inflammation (Raber-Durlacher et al. 1991).

Regarding these two options, it has been postulated that changes in the maternal immune system during pregnancy may contribute to a greater susceptibility to develop gingival inflammation (Lopatin et al. 1980, O'Neil 1979a, Raber-Durlacher et al. 1991). Four main research lines can be distinguished in relation to this issue. In the first, peripheral blood lymphocytes or monocytes from pregnant women were stimulated *in vitro* with different antigens or mitogens (Lopatin et al. 1980, O'Neil 1979a, Polan et al. 1990, Raber-Durlacher et al. 1991). Some authors reported a reduced responsiveness of maternal T-lymphocytes to antigenic stimulation (Lopatin et al. 1980, O'Neil 1979a, Polan et al. 1990) but others found no such evidence (Raber-Durlacher et al. 1991). In the second group of reports, peripheral blood lymphocytes from men and non-pregnant women were stimulated with lipopolysaccharide (LPS) and incubated with different concentrations of progesterone and estradiol (Miyagi et al. 1993, Morishita et al. 1999). Both hormones enhanced the production of prostaglandin E2 (PGE2) (Miyagi et al. 1993) and suppressed the production of interleukin-1 β (IL-1 β) (Morishita et al. 1999). In a third research line, Raber-Durlacher et al. (1993) induced a 14-day experimental gingivitis during pregnancy and postpartum and studied the local immune response in the gingiva, finding a decreasing number of B-cells and macrophages in consecutive gingival biopsies. Finally, human biopsies of healthy and inflamed gingiva have been incubated with estradiol and progesterone, finding that both hormones enhanced PGE2 synthesis (ElAttar 1974).

Only a few human studies have examined the association between increased gingival inflammation during pregnancy and changes in the local immune system. Kinnby et al. (1996) observed a higher gingival inflammatory reaction in women during pregnancy and proposed that changes in hormone levels might have a suppressive effect on local plasminogen activator inhibitor-2

(PAI-2). Yalcin et al. (2002a) found lower GCF PGE2 levels during the second and third trimester in pregnant women treated with scaling and root planing. They concluded that PGE2 levels could be used as a marker of gingival inflammation during pregnancy, although they acknowledged the lack of a control group of untreated pregnant women. Recently, Akalin et al. (2009) reported a decrease in GCF total antioxidant activity and superoxide dismutase enzyme concentrations from the first to the third trimester of pregnancy. However, although the available data indicate that IL-1 β and PGE2 might play a role in gingival inflammation during pregnancy, none of these studies have evaluated their normal behaviour in pregnant women without periodontitis.

With this background, the present longitudinal investigation was designed to simultaneously evaluate the role of different aetiological pathways by means of clinical, hormonal, immunological and microbiological studies. The aim of this first part of the research was to test the hypothesis that the exacerbated gingival inflammation in pregnancy is associated with increased sex hormone levels and changes in GCF IL-1 β and PGE2 levels. The specific objectives were: (1) to prospectively evaluate hormonal, clinical and immunological changes in a group of pregnant women and a control group of non-pregnant women; (2) to assess whether higher gingival inflammatory reaction in pregnant women is associated with a change in GCF IL-1 β or PGE2 change; and (3) to correlate clinical status with immunological and hormonal variables. In a second part (part II. Carrillo et al. Accepted for publication in Journal of Clinical Periodontology) microbiological results from these women will be presented.

Material and methods

Experimental design

This was an open cohort prospective study with parallel design and a 9-month follow-up. Ethical approval was obtained from the Research and Ethics Committee of San Carlos University Hospital (Madrid). All subjects were informed of the scope of the study and their consent was obtained.

Population screening

Based on information from previous reports on pregnancy gingivitis (Cohen 1969, Tilakaratne et al. 2000), a difference of 0.15 on gingival index (Silness & Loe 1963) was considered as a reference. Power calculation was done with Sample Power 2.0 programme. This analysis indicated that with 45 pregnant subjects the study would have 80% power to detect a 0.15 difference in gingival index during pregnancy with alpha set at 0.05.

Therefore, taking into account potential drops-out, sample size was established as 60 pregnant women. Potential subjects were consecutively recruited from the Obstetrics Department of José Marv Hospital (pregnant group) and from the Reception Department of the School of Dentistry of Madrid Complutense University (non-pregnant group). All subjects underwent a periodontal examination, including full-mouth evaluation of probing pocket depth, clinical attachment level and bleeding on probing (6 sites per tooth). After the periodontal diagnosis was established, all subjects who fulfilled inclusion/exclusion criteria (see below) were invited to participate in the study until the desired sample sizes were reached.

Inclusion / exclusion criteria

Inclusion criteria were: (i) age 20-35 years and (ii) presence of ≥ 20 natural teeth in mouth excluding third molars. Exclusion criteria were: (i) diagnosis of chronic/aggressive periodontitis (Armitage 1999); (ii) presence of acute dental or periodontal disease; (iii) smoking habit; (iv) presence of systemic disease and/or medication affecting the periodontium; and (v) receipt of systemic antibiotic treatment or dental prophylaxis in previous 6 months.

In addition, to the above inclusion/exclusion criteria, pregnant women were included if they were in the 12th-14th week of pregnancy in the first visit and non-pregnant women were excluded if they were taking contraceptive drugs or if they were pregnant or planning to be so.

Study design

Data were gathered on the pregnant women at four visits: at the end of the first trimester (12-14 weeks of pregnancy), second trimester (23-25 weeks

of pregnancy) and third trimester (33-36 weeks of pregnancy) and at three months post-delivery. Non-pregnant women received two visits six months apart. The hormone status of the menstrual cycle was controlled by scheduling their visits during the luteal phase (days 17-21) of the cycle. At each visit, saliva and GCF samples were collected (in this order) and a clinical examination was then performed (Figure 1).

Patients also received oral hygiene instructions, a toothbrush (Vitis access®, Dentaïd, Sant Cugat del Vallés, Spain) and a dentifrice (Colgate Total®, Colgate, Piscataway, NJ, USA). At the end of the study, all subjects received a dental prophylaxis.

Questionnaire

All women answered a structured questionnaire at the first visit. It was used to obtain information about their socioeconomic status (age, study level and profession), as well as information on their oral and periodontal status (frequency of tooth brushing, last visit to the dentist and self-evaluation of their oral status).

Clinical examination

One examiner (EF) recorded full-mouth plaque (PII) and gingival (GI) indices at four marginal aspects of all teeth (mesial, distal, buccal and lingual) with a CPC-12 periodontal probe (Hu-Friedy, Leimen, Germany) according to Silness & Loe (1964) and Loe & Silness (1963), respectively.

Saliva sampling

Study participants were asked to rinse their mouths with water, wait for 5 min and then allow saliva to drip from their lower lip into a sterile glass tube for 2 min. Due to technical requirements, all unstimulated whole saliva samples were frozen at -20°C until further evaluation (Meulenberg & Hofman 1989, Morishita et al. 1988).

GCF sampling

A GCF sample was collected by one examiner (EF) from the mesiobuccal sulcus of each upper canine (1.3 and 2.3), using Harco Periopaper (Harco, Irvine, CA, USA) (two samples per patient and per visit). Study sites were selected based

on previous reports of a greater increase in GI on anterior teeth in pregnancy gingivitis (Silness & Loe 1964). Briefly, the site was first isolated with cotton rolls and supragingival plaque was removed without touching the marginal gingiva. A gentle stream of air was directed parallel to the root surface for 5-10 s to dry the area. A periopaper strip was then inserted into the crevice until a slight resistance was felt and was left in place for 30 s (Yucel et al. 2008, Silva et al. 2008). Samples containing blood were discarded (Engebretson et al. 2002), and a new GCF sample was taken from the mesiobuccal sulcus of the adjacent upper premolar (1.4 or 2.4). If this new sample was contaminated, it was discarded and the data were recorded as missing. Each strip was measured for fluid volume with a calibrated Periotron 8000® (Harco, Irvine, CA, USA) (Chapple et al. 1999) and placed in a sterile Eppendorf tube. GFC samples were stored at -80°C until further evaluation.

Progesterone and estradiol assays

After thawing saliva samples at room temperature and centrifuging at 4000 xg for 5 min, supernatants were retrieved for measurement of progesterone and estradiol by means of a competitive immunoenzymatic colorimetric method (DIA.METRA S.r.l, Foligno, Italy). Concentrations were expressed in pg/ml.

IL-1 β and PGE2 assays

GCF samples were thawed at room temperature. GCF was extracted from the paper strips by eluting them with aliquots of buffer (50mM phosphate buffer, pH 7.2, containing protease inhibitor, 0.1 mM phenylmethysulphonyl fluoride, 50 μ g/ml each of leupeptin, pepstatin and antipain) (Uematsu et al. 1996); 200 μ l of this buffer was applied to each strip and kept for 20 min at 4°C. Then, the tubes were centrifuged at 19,000xg for 5 min. The supernatants were collected and used to determine IL-1 β and PGE2 levels. In order to obtain enough levels from each inflammatory mediator, one periopaper strip was used for each of them. Therefore, the GCF sample from the upper right canine (1.3) was used to measure IL-1 β and that from the upper left canine (2.3) to measure PGE2, using enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) (PGE2: DRG Diagnostic, DRG Instruments GmbH, Marburg; Germany; IL-1 β : BLK Diagnostics International,

Badalona, Barcelona; Spain). Analyses were performed according to the manufacturer's protocol. Results were calculated using the standard curves created for each assay. Concentrations were corrected for GCF volume and defined as ng/ml. The total amount of IL-1 β and PGE2 was expressed in picograms (pg).

Data management and statistical analysis

Data were gathered for each woman on mean PII and GI (full-mouth, anterior teeth, posterior teeth), percentage of locations with PII of 1, 2 or 3 (plaque score) and percentage of locations with GI of 1, 2 or 3 (gingivitis score). The ratio of GI to PII was calculated to obtain a numerical value representing the gingival reactivity to plaque (Kinnby, 1996). High-reacting" (HR) and "low-reacting" (LR) subgroups were formed according to whether G/P values in the second trimester were above or below the median, respectively (Kinnby et al. 1996). IL-1 β and PGE2 levels were expressed as amounts (pg) and concentrations (ng/ml), and hormonal levels as concentrations (pg/ml).

A subject-level analysis was performed for each study parameter. Kolmogorov-Smirnov goodness-of-fit tests were computed for each variable to assess whether the variables were normally distributed. Data were expressed by mean and standard deviations (SD) for all variables.

To test the effect of "time" on response variables during pregnancy ANOVA for repeated measures or Friedman's test for parametric and non-parametric variables, respectively, were used. Post hoc comparisons were performed to explore intergroup differences. Correlations between pairs of variables were determined by means of Pearson's (parametric variables) and Spearman's (non-parametric variables) tests.

Analyses of the minimum detectable difference given the obtained sample size and the observed variability was calculated in those cases where non-significant difference was detected throughout pregnancy and post-partum with Sample Power 2.0 programme.

Comparisons between HR and LR groups were performed by using Mann-Whitney U-test for non-parametric variables.

Student's t-test and Mann-Whitney U-test, for parametric or non-parametric variables, respectively, were used to determine differences between pregnant and non-pregnant women.

Statistical significance was established at the 95% confidence level. SPSS for Windows (SPSS Inc. version 16.0) was used for all data analyses.

Results

Patients

Out of the 60 pregnant women invited to participate in the study, 48 gave their informed consent. Three of these women had a miscarriage before the second visit, one had a preterm birth, one was placed in isolation for suspicion of tuberculosis and a sixth withdrew after the second visit for personal reasons (no available time). Data from these six women were excluded from the study. The remaining 42 women complied with the first, second and third visits. After delivery, 26 of these women complied with the fourth visit (Figure 1). The other women withdrew from the study for personal reasons (no time, loss of interest). There were no differences in any study variables between the women who remained in the study during the entire period ($n=26$) and those who left it ($n=16$) (repeated -measures ANOVA) (data not shown).

Out of the 30 non-pregnant women invited to participate in the study, 28 gave their informed consent. Four of these women started taking oral contraceptives after the first visit and four withdrew for personal reasons (no time, no interest). Data from these eight women were excluded from the study (Figure 1). There were no differences in any study variable between the women who remained in the study during the entire period and those who left it (ANOVA repeated measures) (data not shown).

Evolution during pregnancy and postpartum

1. Steroid hormone levels in whole saliva

Table 1 shows progesterone and estradiol values in saliva over the whole study period. The concentration of both hormones significantly increased during pregnancy, reaching a peak in the third trimester ($p<0.001$), and was markedly decreased at three months postpartum ($p<0.001$).

2. Clinical parameters

Plaque index

The full-mouth and posterior-tooth PIs both showed a slight decrease during pregnancy and a non-significant ($p>0.05$) increase at three months postpartum (Table 2). Plaque (PII score 1, 2 or 3) was recorded in 52.97%, 49.31% and 52.67% of sites in the first, second and third trimesters of pregnancy, respectively, compared with 57.82% at 3 months postpartum ($p<0.05$).

Gingival index

Table 3 shows the mean GI of the pregnant group at each examination. Full-mouth GI increased from 1.01 in the first trimester to 1.13 in the second ($p<0.05$), maintained high levels in the third trimester and then decreased to 0.98 at three months postpartum ($p<0.05$). The minimum detectable difference at the post-partum visit resulted in 0.22.

GI in anterior teeth also showed this pattern, whereas no significant change in GI was observed in posterior teeth over the study period. The percentage of sites with inflammation (GI of 1, 2 or 3) was higher ($p<0.05$) in the second trimester (57.53%) than after delivery (49.92%).

Gingival reactivity to plaque (G/P)

A significant increase in G/P in the second trimester of pregnancy was found ($p<0.01$), meanwhile, three months post-partum, G/P values significantly decreased ($p<0.001$) (table 4).

“High-reacting” and “low-reacting” subgroups were formed according to whether G/P values in the second trimester were above or below the median, respectively (Kinnby et al. 1996). G/P values in the first, second and third trimesters of pregnancy were 1.85, 2.46 and 2.17, respectively, for the high-reacting group and 1.55, 1.39 and 1.52, respectively, for the low-reacting group ($p<0.05$ between groups for 1st trimester and $p<0.01$ for 2nd and 3rd). At three months postpartum, differences in G/P values between high (1.72) and low-reacting (1.27) groups disappeared ($p=0.484$).

3. Inflammatory mediators levels in GCF

Due to technical problems, PGE2 levels were only determined in 23 women during pregnancy, in 14 at three months postpartum and in 10 non-pregnant women.

There were no significant changes in IL-1 β or in PGE2 levels (amount or concentration) during pregnancy (Tables 5 and 6). However, analyses revealed that given the obtained results, minima detectable differences for the amount of IL-1 β were 10.55 pg for the increment between the first to the second term, and 9.02 pg for the second to the third term. In the case of PGE2, those values were 4.21 pg and 12.49 pg, respectively.

Three months post-partum, IL-1 β levels and the concentration of PGE2 significantly decreased ($p < 0.05$). Low- and high-reacting groups did not significantly differ in IL-1 β or PGE2 levels (data not shown).

Correlations during pregnancy

GI and PII changes between the first and second trimester were positively correlated ($p < 0.01$; $r = 0.43$), i.e., the higher the rise in PII, the higher was the increase in GI.

No correlation was found between the increase in gingival inflammation (GI, inflammation scores) and the increase in salivary hormone levels during pregnancy ($p > 0.05$).

Because no changes were observed in immunological parameters during pregnancy, they could not be correlated with the increase in gingival inflammation.

Comparison between pregnant and non-pregnant women

Questionnaire results are compiled in Table 7. The mean age was 30.15 yrs (range 20-35) in the pregnant group and 24.38 yrs (range 22-26) in the non-pregnant group ($p < 0.001$). Data on last dental visit and toothbrushing frequency were similar between the groups. However, the educational level was lower in the pregnant than in the non-pregnant group ($p < 0.001$), and most of them were employees (60.69%), whereas most of the non-pregnant women were in liberal

professions (61.52%). Significant differences were also detected in self-perception of oral health status ($p<0.001$).

In the non-pregnant group, there were no statistically significant changes in any study variable over the six-month study period ($p>0.05$) (Tables 1-6).

Hormonal levels

Higher salivary progesterone and estradiol concentrations were found in pregnant versus non-pregnant women at baseline and six-month visits ($p<0.001$). At three months postpartum, the differences between groups disappeared ($p>0.05$) (Table 1).

Clinical parameters

Pregnant women tended to have higher full-mouth PII versus non-pregnant women, and the difference reached significance at the third-trimester visit ($p<0.05$). Groups did not differ in anterior PII or in percentage of locations with plaque at either visit (baseline/1st trimester or six-month/3rd trimester) ($p>0.05$) (Table 2).

GI values (full-mouth, anterior and posterior teeth) were higher in pregnant versus non-pregnant women ($p<0.05$ for 1st and $p<0.001$ for 3rd trimester) (Table 3). Gingival reactivity to plaque was also higher in pregnant versus non-pregnant women ($p=0.032$ for 1st and $p<0.001$ for 3rd trimester) (Table 4).

At three months postpartum, the groups significantly differed in PII ($p=0.008$) and GI ($p=0.001$) but not in gingival reactivity to plaque ($p>0.05$).

Inflammatory mediators in GCF

IL-1 β levels (amount and concentration) were significantly lower in non-pregnant versus pregnant women ($p<0.001$) (Table 5).

PGE2 levels (amount and concentration) were similar between the groups, with no significant differences for 1st or 3rd trimester ($p>0.05$) (Table 6).

Discussion

This open cohort longitudinal study was designed to confirm reports of exacerbated gingival inflammation in pregnant women and to determine whether this reaction is associated with changes in GCF IL-1 β and PGE2 levels and/or increased salivary sex hormone levels. Results obtained showed that gingival inflammation significantly increased during pregnancy, despite plaque scores remaining low or even decreasing. However, GCF IL-1 β and PGE2 concentrations did not change during pregnancy and the greater gingival inflammation was not significantly correlated with higher salivary hormone levels.

The population selected for this study consisted of a group of pregnant women with no presence or history of periodontitis that was compared with a control group of non-pregnant women. Although the initial clinical examination in the selection process included evaluation of probing pocket depths and loss of attachment, these parameters were not followed up because they are known to be unaffected by pregnancy (Cohen et al. 1971, Gursoy et al. 2008, Hugoson 1970, Loe & Silness 1963, Lundgren & Lindhe 1971, O'Neil 1979b, Tilakaratne et al. 2000).

The longitudinal design of our investigation, from the first trimester through three months postpartum, has been used by other studies on the effect of pregnancy over the periodontium (Cohen et al. 1969, Cohen et al. 1971, Tilakaratne et al. 2000, Gursoy et al. 2008). The ability to follow the same individuals throughout the study period improves control over possible confounding factors. A further study strength is that clinical, hormonal and immunological variables were all studied, to our knowledge for the first time together in an observational prospective study of pregnant women without periodontitis.

One of the main study weaknesses was the high incidence of dropouts. This contributed to a reduced sample size (mostly marked at the post-partum visit), which probably influenced the lack of significant differences obtained in some analyses. Therefore, the minimum detectable difference given the sample size and the observed variability was added for each analysis where no significant differences were detected.

A further limitation was the lack of homogeneity between the groups, with pregnant women being older and having received less schooling. Although these data are similar to those previously published by Machuca et al. (1999) and Yalcin et al. (2002b); they should be taken into account as they could have determined some of the differences found between them. Reports from Fransson et al. (1999), Kamma et al. (2009) and Tsalikis et al. (2002) revealed that old subjects develop more gingivitis than young subjects in terms of inflammatory response to *de novo* plaque formation. However, it has to be remarked that criteria used in those reports to distinguish between old and young subjects cannot be applied to this one, as all women included here would comprise the group of young adults (20-35 years). In terms of salivary progesterone levels, Lipson & Ellison (1992) found a pattern of age variation with the highest values in the 25-34 year-old group, intermediate in the 20-24 year-old group and the lowest in 18-19 and 40-44 year-old groups. Therefore, it does not seem reasonable to explain the significant differences found here ($p<0.001$) only in terms of age reasons.

Clinical parameters

The tendency to a decrease in plaque index levels throughout the pregnancy may be attributable to the oral health instruction at the first visit. O'Neil (1979b) and Gursoy et al. (2008) found a reduction in PII levels in pregnant patients receiving oral health instruction at the first visit. However, other authors detected this tendency in patients who had not received this instruction (Cohen et al. 1969, Hugoson 1970, Silness & Loe 1964), hence the Hawthorne effect may also have played a role.

Most studies on pregnancy gingivitis reported an increase in gingival inflammation with a peak in the third trimester (Cohen et al. 1969, Hugoson 1970, Kornman & Loesche 1980, Loe & Silness 1963, Tilakaratne et al. 2000, Yalcin et al. 2002b), while others observed the highest value during the second trimester (Gursoy et al. 2008). The present study demonstrated elevated gingival inflammation throughout pregnancy, with a significant increase in index values from the first to the second trimesters. Although greater inflammation was

observed in posterior versus anterior teeth, the increase in GI was only significant in anterior teeth. These data are in agreement with findings published by [Loe & Silness \(1963\)](#).

A significant higher gingival reactivity to plaque was observed during than after pregnancy, as also found by Kinnby et al. (1996). We were able to differentiate two groups according to their reactivity (high and low reacting groups), as previously reported (Kinnby et al. 1996, Trombelli et al. 2004). However, we were unable to explain this difference in susceptibility to gingivitis as a function of GCF IL-1 β or PGE2 levels. This is in accordance with the results obtained by Trombelli et al. (2005), Trombelli et al. (2006) or Scapoli et al. (2007), who detected no differences between groups in terms of stress (Trombelli et al. 2005), duration of exposure to plaque (Trombelli et al. 2006) or IL-6, TNF- α or lymphotoxin- α polymorphisms (Scapoli et al. 2007).

Hormone levels

Salivary hormone levels were similar to those found in previous reports on pregnant (Jonsson et al. 1988, Meulenberg & Hofman 1989) and non-pregnant women ([Chatterton et al. 2005](#)). Salivary measurement was selected because of the ease of sampling and its accuracy, since it quantifies the free and therefore active levels of steroid hormones ([Chatterton et al. 2005](#), [Kaufman & Lamster 2002](#), [Meulenberg & Hofman 1989](#)).

No significant correlation was found between the increase in salivary hormone levels and the increase in gingival inflammation, as also reported by other authors ([Jonsson et al. 1988](#), [O'Neil 1979b](#)). Only one study reported a significant relationship between gingival index and sex hormone values during pregnancy ([Hugoson 1970](#)), but this was not a true correlation because they used weighted mean values for plasma estradiol and progesterone during normal pregnancy derived from two earlier studies.

IL-1 β and PGE2 levels

The GCF sampling sites (mesial aspect of upper canines) were selected because greater swelling and bleeding on probing has been described in the anterior (incisor/canine) versus posterior (premolar/molar) region during pregnancy (Raber-Durlacher et al. 1993, Raber-Durlacher et al. 1994), with

reports of a wider variation in GI for the anterior region (Loe & Silness 1963) and of a higher GI in interproximal versus buccal or oral areas (Hugoson 1970).

To our best knowledge, no prospective observational studies have been published on IL-1 β and PGE2 levels in pregnant women without periodontitis. IL-1 β is a potent pro-inflammatory cytokine that plays an important role in chronic and acute inflammation (Polak et al. 2009, Ren et al. 2009, Silva et al. 2008, Vernal et al. 2009) and has been reported to stimulate PGE2 synthesis in human fibroblasts from periodontal ligament (Saito et al. 1990). Following *in vitro* findings that progesterone and estradiol enhance PGE2 synthesis at local (ElAttar 1974) and systemic (Miyagi et al. 1993) levels, it was proposed that these increased PGE2 levels may be in part responsible for the exacerbated gingival inflammation (Mascarenhas et al. 2003, Mealey & Moritz 2003, Sooriyamoorthy & Gower 1989). In the present study, PGE2 levels remained unchanged throughout and after pregnancy and were similar to those in non-pregnant women. Therefore, this study would not support the hypothesis that locally released PGE2 is involved in the pathogenesis of pregnancy gingivitis. However these results should be interpreted with caution due to the reduced number of samples analysed, especially in the post-partum visit. Based on these data, calculation on sample size revealed that 2652 patients would have been needed to detect a minimum difference of 24.87pg/ml in PGE2 levels in GCF during pregnancy (from the first to the second term), with alpha set at 0.05 and a study power of 0.80.

We found higher GCF IL-1 β levels in pregnant women than in non-pregnant women in luteal phase. In contrast, previous studies found lower IL-1 β secretion from monocytes isolated during the third trimester of pregnancy (7 IU/ml) than from those isolated during luteal phase (52.4 IU/ml) (Polan et al. 1990), and a suppression in IL-1 β production by peripheral blood lymphocytes by their stimulation with LPS and incubation with progesterone (0.2-200 ng/ml) and estradiol (20 ng/ml) (Morishita et al. 1999). The GCF IL-1 β levels in our pregnant women were similar to those described in patients with chronic or experimental gingivitis (Deinzer et al. 2007, Heasman et al. 1993, Johnson et al. 1997, Kinane et al. 1992, Yucel et al. 2008). However, we found no positive

correlation between the increase in gingival inflammation and IL-1 β levels, in agreement with Gonzales et al. (2001), Yucel et al. (2008) and Bergmann & Deinzer (2008) but in disagreement with Kinane et al. (1992), Heasman et al. (1993) and Johnson et al. (1997). Other factors may have an influence on the gingival inflammation in pregnant woman, such as the potential influence of genetic factors (Lang et al. 2000, Scapoli et al. 2005), which has not been evaluated in the present study; therefore, its potential influence on the reported results may not be excluded.

Because the women were pregnant at the first visit in our study and already had an elevated gingival index, we cannot draw definitive conclusions about the potential influence of IL-1 β on the development of gingival inflammation during pregnancy. We can only speculate that sex hormones may have no direct effect on IL-1 β *in vivo* but rather affect the local environment, increasing oedema and tissue hypertrophy and creating a favourable environment for the overgrowth of microorganisms responsible for triggering an immune-inflammatory reaction. Further research is warranted in this line, analysing other local inflammatory mediators and applying microbiological tests to investigate the clinical relevance of these findings.

Conclusion

Within the limitations of this study, the results obtained confirm the exacerbation of gingival inflammation during pregnancy, which is specially marked in anterior teeth. This exacerbation could not be associated with increased salivary progesterone or estradiol concentrations or with changes in PGE2 or IL-1 β levels. The elevated IL-1 β levels observed might result from the creation of a favourable local environment rather than from the direct effects of sex hormones; however, more studies with increased sample sizes are needed within this field.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Dr Itziar González, Ana O’Connor and Rubén León for their assistance at the research laboratory, and Dr. Pedro Cuesta and Santiago Cano for their statistical assistance. We are also grateful to Prof. Ubele van der Velden and Prof. Mariano Sanz, for their constructive comments; to Dr. Antonio González and Dr. Miguel Gallardo of La Paz Hospital, Madrid who provided the facilities for examination of the pregnant-women; and to Colgate and Dentaïd that supplied the toothbrushes and the dentifrices for the patients.

For Peer Review

References

- Akalin, F.A., Baltacioglu, E., Alver, A. & Karabulut, E. (2009) Total antioxidant capacity and superoxide dismutase activity levels in serum and gingival crevicular fluid in pregnant women with chronic periodontitis. *Journal of Periodontology* **80**, 457-467.
- Armitage, G.C. (1999) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of Periodontology* **4**, 1-6.
- Bergmann, A. & Deinzer, R. (2008) Daytime variations of interleukin-1beta in gingival crevicular fluid. *European Journal of Oral Sciences* **116**, 18-22.
- Carrillo-de-Albornoz, A., Figuero, E., Herrera, D. & Bascones-Martínez, A. *Journal of Clinical Periodontology*. Accepted.
- Chaikin, B.S. (1977) Incidence of gingivitis in pregnancy. *Quintessence International Dental Digest* **8**, 81-89.
- Chapple, I.L., Landini, G., Griffiths, G.S., Patel, N.C. & Ward, R.S. (1999) Calibration of the Periotron 8000 and 6000 by polynomial regression. *Journal of Periodontal Research* **34**, 79-86.
- Chatterton, R.T., Jr., Mateo, E.T., Hou, N., Rademaker, A.W., Acharya, S., Jordan, V.C. & Morrow, M. (2005) Characteristics of salivary profiles of oestradiol and progesterone in premenopausal women. *Journal of Endocrinology* **186**, 77-84.
- Cohen, D.W., Friedman, L., Shapiro, J. & Kyle, G.C. (1969) A longitudinal investigation of the periodontal changes during pregnancy. *Journal of Periodontology* **40**, 563-570.
- Cohen, D.W., Shapiro, J., Friedman, L., Kyle, G.C. & Franklin, S. (1971) A longitudinal investigation of the periodontal changes during pregnancy and fifteen months post-partum. II. *Journal of Periodontology* **42**, 653-657.
- Deinzer, R., Weik, U., Kolb-Bachofen, V. & Herforth, A. (2007) Comparison of experimental gingivitis with persistent gingivitis: differences in clinical parameters and cytokine concentrations. *Journal of Periodontal Research* **42**, 318-324.

ElAttar, T.M. & Hugoson, A. (1974) Comparative metabolism of female sex steroids in normal and chronically inflamed gingiva of the dog. *Journal of Periodontal Research* **9**, 284-289.

Engelbreton, S.P., Grbic, J.T., Singer, R. & Lamster, I.B. (2002) GCF IL-1beta profiles in periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* **29**, 48-53.

Fransson, C., Mooney, J., Kinane, D.F. & Berglundh, T. (1999) Differences in the inflammatory response in young and old human subjects during the course of experimental gingivitis. *Journal of Clinical Periodontology* **26**, 453-460.

Gonzales, J.R., Herrmann, J.M., Boedeker, R.H., Francz, P.I., Biesalski, H. & Meyle, J. (2001) Concentration of interleukin-1beta and neutrophil elastase activity in gingival crevicular fluid during experimental gingivitis. *Journal of Clinical Periodontology* **28**, 544-549.

Gursoy, M., Pajukanta, R., Sorsa, T. & Kononen, E. (2008) Clinical changes in periodontium during pregnancy and post-partum. *Journal of Clinical Periodontology* **35**, 576-583.

Heasman, P.A., Collins, J.G. & Offenbacher, S. (1993) Changes in crevicular fluid levels of interleukin-1 beta, leukotriene B4, prostaglandin E2, thromboxane B2 and tumour necrosis factor alpha in experimental gingivitis in humans. *Journal of Periodontal Research* **28**, 241-247.

Hugoson, A. (1970) Gingival inflammation and female sex hormones. A clinical investigation of pregnant women and experimental studies in dogs. *Journal of Periodontal Research* Suppl **5**, 1-18.

Johnson, T.C., Reinhardt, R.A., Payne, J.B., Dyer, J.K. & Patil, K.D. (1997) Experimental gingivitis in periodontitis-susceptible subjects. *Journal of Clinical Periodontology* **24**, 618-625.

Jonsson, R., Howland, B.E. & Bowden, G.H. (1988) Relationships between periodontal health, salivary steroids, and *Bacteroides intermedius* in males, pregnant and non-pregnant women. *Journal of Dental Research* **67**, 1062-1069.

- Kamma, J., Mombelli, A., Tsinidou, K., Vasdekis, V. & Giannopoulou, C. (2009) Cytokines in gingival crevicular fluid of adolescents and young adults. *Oral Microbiology and Immunology* **24**, 7-10.
- Kaufman, E. & Lamster, I.B. (2002) The diagnostic applications of saliva--a review. *Critical reviews in oral biology and medicine* **13**, 197-212.
- Kinane, D.F., Winstanley, F.P., Adonogianaki, E. & Moughal, N.A. (1992) Bioassay of interleukin 1 (IL-1) in human gingival crevicular fluid during experimental gingivitis. *Archives of Oral Biology* **37**, 153-156.
- Kinnby, B., Matsson, L. & Astedt, B. (1996) Aggravation of gingival inflammatory symptoms during pregnancy associated with the concentration of plasminogen activator inhibitor type 2 (PAI-2) in gingival fluid. *Journal of Periodontal Research* **31**, 271-277.
- Kornman, K.S. & Loesche, W.J. (1980) The subgingival microbial flora during pregnancy. *Journal of Periodontal Research* **15**, 111-122.
- Lang, N.P., Tonetti, M.S., Suter, J., Sorrell, J., Duff, G.W. & Kornman, K.S. (2000) Effect of interleukin-1 gene polymorphisms on gingival inflammation assessed by bleeding on probing in a periodontal maintenance population. *Journal of Periodontal Research* **35**, 102-107.
- Lindhe, J. & Branemark, P.I. (1967a) Changes in microcirculation after local application of sex hormones. *Journal of Periodontal Research* **2**, 185-193.
- Lindhe, J., Branemark, P.I. & Lundskog, J. (1967) Changes in vascular proliferation after local application of sex hormones. *Journal of Periodontal Research* **2**, 266-272.
- Lindhe, J. & Attsfrom, R. (1967) Gingival exudation during the menstrual cycle. *Journal of Periodontal Research* **2**, 194-198.
- Lipson, S.F. & Ellison, P.T. (1992) Normative study of age variation in salivary progesterone profiles. *Journal of Biosocial Science* **24**, 233-244.
- Loe, H. & Silness, J. (1963) Periodontal Disease in Pregnancy. I. Prevalence and Severity. *Acta Odontologica Scandinavica* **21**, 533-551.
- Lopatin, D.E., Kornman, K.S. & Loesche, W.J. (1980) Modulation of immunoreactivity to periodontal disease-associated microorganisms during pregnancy. *Infection and Immunity* **28**, 713-718.

Lundgren, D. & Lindhe, J. (1971) Lack of influence of female sex hormones on alveolar bone loss in hamsters. *Scandinavian Journal of Dental Research* **79**, 113-118.

Machuca, G., Khoshfeiz, O., Lacalle, J.R., Machuca, C. & Bullon, P. (1999) The influence of general health and socio-cultural variables on the periodontal condition of pregnant women. *Journal of Periodontology* **70**, 779-785.

Maier, A.W. & Orban, B. (1949) Gingivitis in pregnancy. *Oral surgery, Oral medicine, and Oral pathology* **2**, 334-373.

Mariotti, A. (1994) Sex steroid hormones and cell dynamics in the periodontium. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* **5**, 27-53.

Mascarenhas, P., Gapski, R., Al-Shammari, K. & Wang, H.L. (2003) Influence of sex hormones on the periodontium. *Journal of Clinical Periodontology* **30**, 671-681.

Mealey, B.L. & Moritz, A.J. (2003) Hormonal influences: effects of diabetes mellitus and endogenous female sex steroid hormones on the periodontium. *Periodontology 2000* **32**, 59-81.

Meulenberg, P.M. & Hofman, J.A. (1989) Salivary progesterone excellently reflects free and total progesterone in plasma during pregnancy. *Clinical Chemistry* **35**, 168-172.

Miyagi, M., Morishita, M. & Iwamoto, Y. (1993) Effects of sex hormones on production of prostaglandin E2 by human peripheral monocytes. *Journal of Periodontology* **64**, 1075-1078.

Miyazaki, H., Yamashita, Y., Shirahama, R., Goto-Kimura, K., Shimada, N., Sogame, A. & Takehara, T. (1991) Periodontal condition of pregnant women assessed by CPITN. *Journal of Clinical Periodontology* **18**, 751-754.

Morishita, M., Miyagi, M. & Iwamoto, Y. (1999) Effects of sex hormones on production of interleukin-1 by human peripheral monocytes. *Journal of Periodontology* **70**, 757-760.

O'Neil, T.C. (1979a) Maternal T-lymphocyte response and gingivitis in pregnancy. *Journal of Periodontology* **50**, 178-184.

O'Neil, T.C. (1979b) Plasma female sex-hormone levels and gingivitis in pregnancy. *Journal of Periodontology* **50**, 279-282.

- Polak, D., Wilensky, A., Shapira, L., Halabi, A., Goldstein, D., Weiss, E.I. & Hourihaddad, Y. (2009) Mouse model of experimental periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis*/*Fusobacterium nucleatum* infection: bone loss and host response. *Journal of Clinical Periodontology* **36**, 406-410.
- Polan, M.L., Kuo, A., Loukides, J. & Bottomly, K. (1990) Cultured human luteal peripheral monocytes secrete increased levels of interleukin-1. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **70**, 480-484.
- Raber-Durlacher, J.E., Leene, W., Palmer-Bouva, C.C., Raber, J. & Abraham-Inpijn, L. (1993) Experimental gingivitis during pregnancy and post-partum: immunohistochemical aspects. *Journal of Periodontology* **64**, 211-218.
- Raber-Durlacher, J.E., van Steenberghe, T.J., Van der Velden, U., de Graaff, J. & Abraham-Inpijn, L. (1994) Experimental gingivitis during pregnancy and post-partum: clinical, endocrinological, and microbiological aspects. *Journal of Clinical Periodontology* **21**, 549-558.
- Raber-Durlacher, J.E., Zeijlemaker, W.P., Meinesz, A.A. & Abraham-Inpijn, L. (1991) CD4 to CD8 ratio and in vitro lymphoproliferative responses during experimental gingivitis in pregnancy and post-partum. *Journal of Periodontology* **62**, 663-667.
- Ren, L., Jiang, Z.Q., Fu, Y., Leung, W.K. & Jin, L. (2009) The interplay of lipopolysaccharide-binding protein and cytokines in periodontal health and disease. *Journal of Clinical Periodontology* **36**, 619-626.
- Saito, S., Ngan, P., Saito, M., Lanese, R., Shanfeld, J. & Davidovitch, Z. (1990) Interactive effects between cytokines on PGE production by human periodontal ligament fibroblasts in vitro. *Journal of Dental Research* **69**, 1456-1462.
- Samant, A., Malik, C.P., Chabra, S.K. & Devi, P.K. (1976) Gingivitis and periodontal disease in pregnancy. *Journal of Periodontology* **47**, 415-418.
- Scapoli, C., Tatakis, D.N., Mamolini, E. & Trombelli, L. (2005) Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis: interleukin-1 gene cluster polymorphisms. *Journal of Periodontology* **76**, 49-56.

Scapoli, C., Mamolini, E. & Trombelli, L. (2007) Role of IL-6, TNF-A and LT-A variants in the modulation of the clinical expression of plaque-induced gingivitis. *Journal of Clinical Periodontology* **34**, 1031-1038.

Silness, J. & Loe, H. (1964) Periodontal Disease in Pregnancy. (II). Correlation between Oral Hygiene and Periodontal Condition. *Acta Odontologica Scandinavica* **22**, 121-135.

Silva, N., Dutzan, N., Hernandez, M., Dezerega, A., Rivera, O., Aguillon, J.C., Aravena, O., Lastres, P., Pozo, P., Vernal, R. & Gamonal, J. (2008) Characterization of progressive periodontal lesions in chronic periodontitis patients: levels of chemokines, cytokines, matrix metalloproteinase-13, periodontal pathogens and inflammatory cells. *Journal of Clinical Periodontology* **35**, 206-214.

Sooriyamoorthy, M. & Gower, D.B. (1989) Hormonal influences on gingival tissue: relationship to periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* **16**, 201-208.

Tilakaratne, A., Soory, M., Ranasinghe, A.W., Corea, S.M., Ekanayake, S.L. & de Silva, M. (2000) Periodontal disease status during pregnancy and 3 months post-partum, in a rural population of Sri-Lankan women. *Journal of Clinical Periodontology* **27**, 787-792.

Trombelli, L., Scapoli, C., Calura, G. & Tatakis, D.N. (2006) Time as a factor in the identification of subjects with different susceptibility to plaque-induced gingivitis. *Journal of Clinical Periodontology* **33**, 324-328.

Trombelli, L., Scapoli, C., Tatakis, D.N. & Grassi, L. (2005) Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis: effects of personality traits, social support and stress. *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 1143-1150.

Trombelli, L., Tatakis, D.N., Scapoli, C., Bottega, S., Orlandini, E. & Tosi, M. (2004) Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis. II. Identification of "high-responder" and "low-responder" subjects. *Journal of Clinical Periodontology* **31**, 239-252.

Tsalikis, L., Parapanisiou, E., Bata-Kyrkou, A., Polymenides, Z. & Konstantinidis, A. (2002) Crevicular fluid levels of interleukin-1alpha and interleukin-1beta

- during experimental gingivitis in young and old adults. *Journal of International Academy of Periodontology* **4**, 5-11.
- Uematsu, S., Mogi, M. & Deguchi, T. (1996) Increase of transforming growth factor-beta 1 in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *Archives of Oral Biology* **41**, 1091-1095.
- Vernal, R., Leon, R., Silva, A., van Winkelhoff, A.J., Garcia-Sanz, J.A. & Sanz, M. (2009) Differential cytokine expression by human dendritic cells in response to different *Porphyromonas gingivalis* capsular serotypes. *Journal of Clinical Periodontology* **36**, 823-829.
- Yalcin, F., Basegmez, C., Isik, G., Berber, L., Eskinazi, E., Soydinc, M., Issever, H. & Onan, U. (2002a) The effects of periodontal therapy on intracrevicular prostaglandin E2 concentrations and clinical parameters in pregnancy. *Journal of Periodontology* **73**, 173-177.
- Yalcin, F., Eskinazi, E., Soydinc, M., Basegmez, C., Issever, H., Isik, G., Berber, L., Has, R., Sabuncu, H. & Onan, U. (2002b) The effect of sociocultural status on periodontal conditions in pregnancy. *Journal of Periodontology* **73**, 178-182.
- Yucel, O.O., Berker, E., Gariboglu, S. & Otlu, H. (2008) Interleukin-11, interleukin-1beta, interleukin-12 and the pathogenesis of inflammatory periodontal diseases. *Journal of Clinical Periodontology* **35**, 365-370.

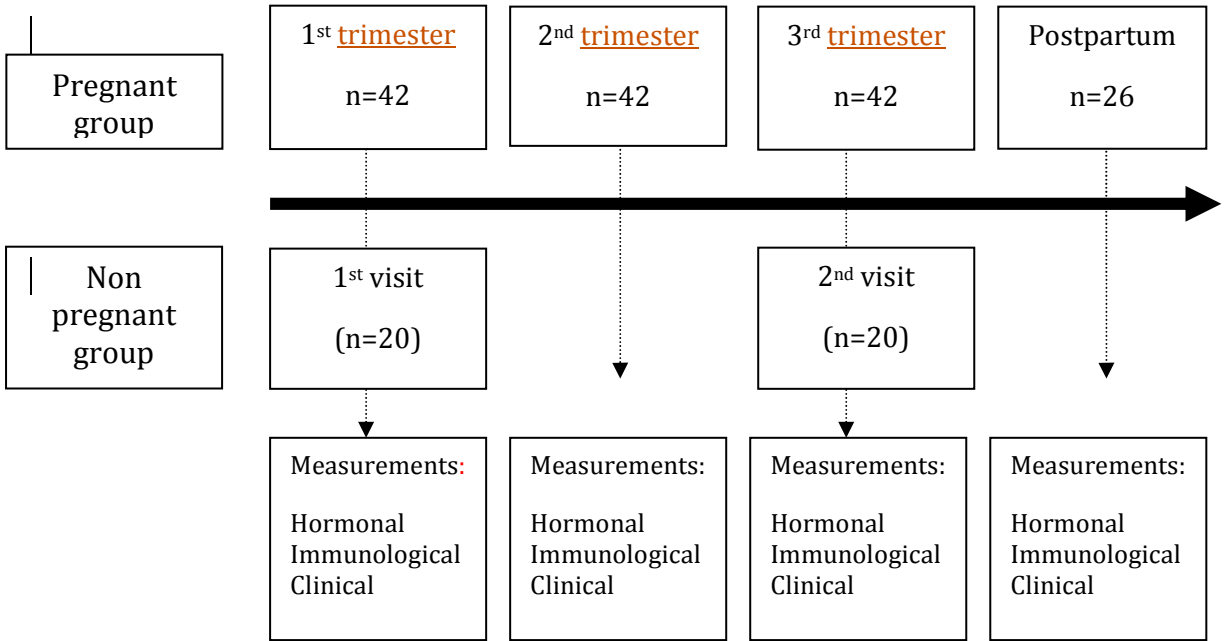


Figure 1: Flow-chart of follow-up of pregnant group and non-pregnant groups.

Hormones in saliva (pg/ml) - mean (SD)				
Pregnant group				
	1 st trimester	2 nd trimester	3 rd trimester	Postpartum
	(n=42)	(n=42)	(n=42)	(n=26)
Progesterone	249.75 (196.03)	545.14 (344.83)**	1543.10 (760.38)***	11.11(20.16)***
Estradiol	0.96 (2.56)	4.94 (12.35)*	24.38 (32.12)*	0.02 (0.09)***
Non-pregnant group				
	Baseline	6 months		
	(n=20)	(n=20)		
Progesterone	20.63 (30.12)	40.03 (91.12)		
Estradiol	0.01 (0.06)	0.01 (0.04)		

Table 1: Progesterone and estradiol levels (pg/ml) in saliva of pregnant and non-pregnant women.

Intragroup comparison: Friedman's test with Bonferroni corrections. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001

Plaque index - mean (SD)				
Pregnant group				
	1 st trimester	2 nd trimester	3 rd trimester	Postpartum
	(n=42)	(n=42)	(n=42)	(n=26)
Full-mouth	0.71 (0.43)	0.65 (0.33)	0.68 (0.30)	0.72 (0.28)
Anterior	0.66 (0.46)	0.60 (0.36)	0.61 (0.35)	0.68 (0.33)*
Posterior	0.75 (0.43)	0.69 (0.36)	0.73 (0.29)	0.76 (0.28)
Non-pregnant group				
	Baseline	6 months		
	(n=20)	(n=20)		
Full-mouth	0.53 (0.31)	0.50 (0.23)		
Anterior	0.50 (0.43)	0.46 (0.26)		
Posterior	0.56 (0.26)	0.54 (0.25)		

Table 2: Plaque index values and plaque scores (PII= 1, 2 or 3) in pregnant and non-pregnant women (full-mouth, anterior teeth, posterior teeth).
Intragroup comparison: ANOVA repeated measures. *p<0.05; **p<0.01

Gingival index - mean (SD)				
	Pregnant group			
	1 st trimester	2 nd trimester	3 rd trimester	Postpartum
	(n=42)	(n=42)	(n=42)	(n=26)
Full-mouth	1.01 (0.41)	1.13 (0.43)*	1.14 (0.44)	0.98 (0.40)
Anterior	0.95 (0.50)	1.12 (0.50)*	1.10 (0.54)	0.93 (0.39)
Posterior	1.06 (0.40)	1.14 (0.42)	1.16 (0.43)	1.02 (0.45)
	Non-pregnant group			
	Baseline	6 months		
	(n=20)	(n=20)		
Full-mouth	0.65 (0.44)	0.58 (0.28)		
Anterior	0.64 (0.47)	0.47 (0.30)		
Posterior	0.65 (0.43)	0.66 (0.29)		

Table 3: Gingival index values and gingivitis scores (GI=1, 2 or 3) in pregnant and non-pregnant women (full-mouth, anterior teeth, posterior teeth).
Intragroup comparison: ANOVA repeated measures. *p<0.05.

Gingival reactivity to plaque				
	Pregnant group			
	1 st trimester	2 nd trimester	3 rd trimester	Postpartum
	(n=42)	(n=42)	(n=42)	(n=26)
General	1.70 (0.86)	1.93 (0.72)**	1.85 (0.78)	1.53 (0.99)***
High reactant	1.85 (0.80)	2.46 (0.59)***	2.17 (0.85)	1.72 (1.25)*
Low reactant	1.55 (0.92)	1.39 (0.35)	1.52 (0.56)	1.27 (0.38)**
	Non-pregnant group			
	Baseline	6 months		
	(n=20)	(n=20)		
General	1.35 (0.76)	1.23 (0.54)		

Table 4: Gingival reactivity to plaque (GI/PLI; mean (SD)) in pregnant and non-pregnant women.

Intragroup comparison: Friedman’s test with Bonferroni corrections. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

IL-1 β - mean (SD)				
Pregnant group				
	1 st trimester	2 nd trimester	3 rd trimester	Postpartum
	(n=42)	(n=42)	(n=42)	(n=26)
Amount (pg)	30.05 (27.05)	23.28 (22.98)	30.45(24.61)	17.46 (16.64)**
Concentration	73.12 (57.93)	70.01 (69.68)	85.27 (69.66)	51.78 (53.58)*
(ng/ml)				
Non-pregnant group				
	Baseline	6 months		
	(n=20)	(n=20)		
Amount (pg)	3.66 (3.39)	4.54 (5.90)		
Concentration	14.00 (18.13)	12.00 (10.69)		
(ng/ml)				

Table 5: IL-1 β levels (amount and concentration) in gingival crevicular fluid of pregnant and non-pregnant women.

Intragroup comparison: Friedman’s test with Bonferroni corrections; **p<0.01

PGE2 - mean (SD)				
	Pregnant group			
	1 st trimester	2 nd trimester	3 rd trimester	Postpartum
	(n=23)	(n=23)	(n=23)	(n=14)
Amount (pg)	19.85 (6.77)	19.46 (7.38)	21.41 (10.41)	20.71 (8.80)
Concentration (ng/ml)	67.32 (35.78)	68.75 (30.89)	69.56 (31.62)	50.36 (23.06)*
	Non-pregnant group			
	Baseline	6 months		
	(n=10)	(n=10)		
Amount (pg)	21.88 (13.88)	16.09 (8.18)		
Concentration (ng/ml)	80.39 (69.17)	76.78 (53.38)		

Table 6: PGE2 levels (amount and concentration) in gingival crevicular fluid of pregnant and non-pregnant women.
Intragroup comparison: Friedman’s test with Bonferroni corrections: *p<0.05.

	Pregnant group	Non-pregnant group	p*
Age	30.15 y (range 20-35)	24.38 y (range 22-26)	<0.001
Education level			<0.001
None	1.9 %	0 %	
Primary	7.4 %	0 %	
Secondary	50 %	3.8 %	
University	40.7 %	96.2 %	
Profession			<0.001
Employees	60.7 %	15.5 %	
Liberal profession	16.1 %	61.5 %	
Housewife	23.2 %	0 %	
Student	0 %	23.1 %	
Frequency of tooth-brushing			NS
3 times/day	59.6 %	76.9 %	
2 times/day	31.6 %	23.2 %	
Once/day	7 %	0 %	
Less than once/ day	1.8 %	0 %	
Last visit to dentist			NS
<1 year	23.1 %	28.1 %	
1 year	65.4 %	47.4 %	
> 1 year	11.5 %	24.6 %	
Self-perception of oral health:			<0.001
Poor	10.5 %	3.8 %	
Normal	40.4 %	7.7 %	
Good	49.1 %	88.5 %	

Table 7: Demographic description of the study population.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

* χ^2 for all parameters except age (Student t-test); NS, not statistically significant.

For Peer Review



Gingival changes during pregnancy (II). Influence of hormonal variations on the subgingival biofilm

Journal:	<i>Journal of Clinical Periodontology</i>
Manuscript ID:	CPE-07-09-2164.R1
Manuscript Type:	Original Article Clinical Periodontology
Date Submitted by the Author:	07-Sep-2009
Complete List of Authors:	Carrillo-de-Albornoz, Ana; Complutense University, Periodontology Figuero, Elena; Complutense University, Periodontology Herrera, David; University Complutense, Periodontics Bascones-Martinez, Antonio; Facultad de Odontología, Medicina y Cirugía Bucofacial
Topic:	Aetiology
Keywords:	Gingivitis, Pregnancy gingivitis, Microbiology, Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia
Main Methodology:	Other



ORIGINAL RESEARCH ARTICLE: CLINICAL PERIODONTOLOGY

Type of manuscript: Original Research Article.

Title. Gingival changes during pregnancy (II). Influence of hormonal variations on the subgingival biofilm.

Running title. Subgingival microbiology in pregnancy.

Authors. Carrillo-de-Albornoz, Ana; Figuero, Elena; Herrera, David; Bascones-Martínez, Antonio.

Key words. Pregnancy gingivitis, biofilm, microbiology, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*.

Institution. Department of Periodontology, School of Dentistry, Complutense University of Madrid, Spain.

Corresponding Author.

Ana Carrillo de Albornoz Sainz

Address. Departamento de Estomatología III. Facultad de Odontología. Universidad Complutense de Madrid. Plaza Ramón y Cajal S/N. 28040. Madrid. Spain.

Telephone Number: (+34) 913941934.

Fax Number: (+34) 913941910

E-mail address: anacarrillodea@gmail.com

Source of funding

This research was partially supported by grants from the Autonomous Community of Madrid (Spain) and the Education Ministry of Spain (AP2002-3116). Dentaïd freely supplied toothbrushes (Vitis access ®, Dentaïd, Sant Cugat del Vallés, Spain). Colgate freely supplied dentifrices (Colgate total ®, Colgate, Piscataway, NJ, USA).

Conflict of interests

The authors declare that they have no conflict of interests.

For Peer Review

Abstract

Aim: To determine whether the exacerbated gingival inflammation developed in pregnant women is related to a change in the subgingival biofilm induced by the increase in hormone levels during pregnancy.

Material and Methods: This open cohort study included 48 pregnant and 28 non-pregnant women without periodontitis. Pregnant women were evaluated in the first, second and third trimester and at three months after delivery. Non-pregnant women were evaluated twice, with a six-month interval, assessing microbiological, clinical and hormonal variables at each visit. Total anaerobic counts and frequency of detection and proportions were calculated. Friedman test with the Bonferroni correction was used for intra-group comparisons and Mann-Whitney U tests for intergroup assessment. Correlations were analysed by means of Spearman's rank correlation coefficient.

Results: Proportions of the subgingival periodontal pathogens did not differ throughout pregnancy, although significant differences were found for all the pathogens after delivery. *P.gingivalis* positive patients presented an increase in gingival inflammation ($p<0.001$) that was not related to plaque. Correlations between maternal hormone levels and *P. gingivalis* and *P. intermedia* were found.

Conclusion: Qualitative differences in periodontal pathogens were found from pregnancy to post-partum. Patients harbouring *P. gingivalis* presented and increased gingival inflammatory status.

Clinical relevance

Scientific rationale for the study: The role of microbiological changes in the aetiopathogeny of pregnancy gingivitis has been widely researched, but published results have been controversial.

Principal findings: We found a qualitative change in subgingival bacteria composition concomitant with a worsening of gingival inflammation.

Practical implications: These findings contribute to our knowledge of the microbiology present throughout pregnancy, which is associated with the worsened gingival inflammation characteristic of this state.

Gingival changes during pregnancy (II). Influence of hormonal variations on the subgingival biofilm.

Pregnancy gingivitis, defined as the gingival inflammation initiated by plaque and exacerbated by endogenous sex steroid hormones (Mariotti, 1999), is a common entity that affects 36-100% of pregnant women (Maier et al. 1949, Jensen et al. 1981, Loe & Silness 1963). The influence of endogenous sex hormones on the periodontium is recognized in the currently accepted periodontal disease classification under the category of “dental plaque-induced gingival diseases modified by the endocrine system”, including gingivitis associated with puberty, menstruation and pregnancy (Armitage 1999).

The clinical features of pregnancy gingivitis do not differ from those of common gingivitis except for the tendency to develop severe signs of gingival inflammation without associated changes in plaque levels (Loe & Silness 1963, Silness & Loe 1964, Arafat et al. 1974, Chaikin et al. 1977, O’Neil 1979a, Hugoson et al. 1970, Tilakaratne et al. 2000, Gursoy et al. 2008). Most reports show an increase in the incidence of pregnancy gingivitis (Loe & Silness 1963, Silness & Loe 1964, Loe 1965, Cohen et al. 1969, Cohen et al. 1971, Hugoson 1970, 1971, Arafat 1974, O’Neil 1979b, Samant et al. 1976, Zaki et al. 1984, Miyazaki et al. 1991, Machuca et al. 1999, Muramatsu & Takaesu 1994, Tilakaratne et al. 2000, Yalcin et al. 2002b, Gursoy et al. 2008), although not all women present the same inflammatory pattern and cases can range from mild inflammation to severe hyperplasia, pain and profuse bleeding (Samant et al. 1976, Guncu et al. 2005, Thomson et al. 1982). Although pregnancy gingivitis is not related to the level of plaque, it requires a minimum amount and does not develop in pregnant woman with excellent plaque control (Arafat et al. 1974, Chaikin et al. 1977). The most frequently affected areas appear to be the anterior sextants of the oral cavity, especially interproximal sites (Loe 1963, Raber-Durlacher et al. 1994). Pregnancy gingivitis is characteristically self-limiting and abates postpartum with the fall in hormone production (Hugoson 1971). A further characteristic of this entity is that it carries no risk of developing periodontitis, despite the inflammatory status developed (Cohen et al. 1969, Tilakaratne et al. 2000, Lieff et al. 2004, Machuca et al. 1999).

Although exacerbated gingival inflammation in pregnant women is clinically and histologically well documented, its aetiology has not yet been clearly established and it is not known why only some pregnant women develop frank signs of gingival

inflammation (Amar et al. 1994, Mariotti et al. 1994, Laine et al. 2002, Mealey et al. 2003, Mascharenas et al. 2003). Four potential mechanisms have been proposed, including: an increase in vascular permeability (Lindhe et al. 1967, Lindhe & Branemark 1967a, Lindhe & Branemark 1967b, Lindhe & Branemark 1968a, Lindhe & Branemark 1968b, Hoffman et al. 1981); a change to a more susceptible gingival phenotype (Dyer et al. 1980, Mariotti et al. 2005), immune system depression (O'Neil 1979b, Lopatin et al. 1980, Raber-Durlacher et al. 1993, Miyagi et al. 1993, Lapp et al. 1995, Lapp et al. 2003); and changes in the sub- or supra-gingival biofilm (Kornman & Loesche 1980, Jensen et al. 1981, Raber-Durlacher et al. 1994).

One of the most solidly based hypotheses is a possible change in the subgingival biofilm. However, limited data exist on the composition of the subgingival microbiota during pregnancy. Direct and indirect aetiopathogenic pathways have been proposed. According to the former, the rise in hormone levels would promote the overgrowth of specific pathogenic bacteria that are responsible for the increased gingival inflammation. Thus, Kornman & Loesche (1982) demonstrated that *Prevotella intermedia* and *Porphyromonas gingivalis* (to a lesser extent) can replace progesterone or estradiol with vitamin K, an essential growth factor for this bacteria (Gibbons & McDonald 1960). In the indirect pathway, the greater exposure to sex steroid hormones would transform the gingiva into a more susceptible environment due to greater gingival probing depths (Miyazaki et al. 1991), higher gingival crevicular flow rate (Lindhe et al. 1968), lower keratinization of the marginal gingival epithelium and reduced immunoresponsiveness, which would together favour the entry of more pathogenic bacteria into the subgingival biofilm. Accordingly, the presence of the pathogen would be the consequence and not the cause of the condition.

Various cross-sectional and longitudinal studies have evaluated the effects of sex steroid hormones on the subgingival biofilm, but the results have been inconclusive and this issue remains controversial. Several authors have proposed the increase in *P. intermedia* during pregnancy as an aetiological factor in pregnancy gingivitis. Kornman & Loesche (1980) were the first to describe an increase in *P. intermedia* during the second trimester concomitant with an increase in gingival inflammation. A cross-sectional study by Jensen (1981) found a 55-fold higher level of *P. intermedia* in pregnant versus non-pregnant women. An association between higher *P. intermedia* levels and increased gingival inflammation was also reported using an experimental gingivitis model in pregnant patients, whereas the elevated inflammation status

observed during pregnancy was not observed postpartum using the same model (Raber-Durlacher et al. 1994). However, other authors found no microbiological differences between pregnant and non-pregnant women (Jonsson et al. 1988, Gürsoy et al. 2009).

Controversy also surrounds the gingivitis related to hormonal alterations associated with puberty, contraceptive intake or the menstrual cycle. Qualitative changes in the biofilm, especially the overgrowth of *P. intermedia* (Nakagawa et al. 1994, Delaney et al. 1986, van Oosten 1988, Mombelli et al. 1990), have also been implicated in the increased severity of gingivitis in these situations. Other microbiological findings, such as the increase in *Capnocytophaga* sp. before the rise in *P. intermedia*, have implicated this bacterial species in the onset of puberty gingivitis (Mombelli et al. 1990). However, some authors found no relevant changes in the biofilm (Gusberti et al. 1990, Yanover et al. 1986).

After clinical, hormonal and immunological data were analysed in the first part of the present longitudinal study (part I, Figuero et al, submitted), the objective of this second part (part II) was to test the hypothesis that pregnancy induces changes in the subgingival biofilm that are responsible for the exacerbated gingival inflammation developed in pregnant women. The specific study objectives were: (1) to longitudinally and prospectively evaluate any change in microbiological status over the three trimesters of pregnancy; (2) to assess whether the presence of periodontal pathogens is associated with an increase in gingival inflammation; and (3) to correlate microbiological patterns with clinical and hormonal status. In a secondary analysis, the microbiological results were compared with findings at the postpartum visit and with a group of non-pregnant women.

Material and methods

Experimental design

This was an open cohort prospective study with parallel design and a 9-month follow-up. All participants signed their informed consent to participation in the study, which was approved by the Research and Ethics Committee of San Carlos University Hospital (Madrid).

Population screening

Based on information from previous reports on pregnancy gingivitis (Cohen 1969, Tilakaratne et al. 2000), a difference of 0.15 in the gingival index (Silness & Loe 1963) was considered as a reference. Power calculation was done with the Sample Power 2.0 software pack. This analysis indicated that with 45 pregnant subjects the study would have 80% power to detect a 0.15 difference in gingival index during pregnancy with alpha set at 0.05.

Therefore, taking into account potential drops-out, sample size was established in 60 pregnant women. Potential subjects were consecutively recruited from the Obstetrics Department of José Marv Hospital (pregnant group) and from the Reception Department of the School of Dentistry of Madrid Complutense University (non-pregnant group). All subjects underwent a periodontal examination, including full-mouth evaluation of probing pocket depth, clinical attachment level and bleeding on probing (6 sites per tooth). After the periodontal diagnosis was established, all subjects who fulfilled inclusion/exclusion criteria (see below) were invited to participate in the study until the desired sample sizes were reached.

Inclusion / exclusion criteria

Inclusion criteria were: (i) age 20-35 years and (ii) presence of ≥ 20 natural teeth in mouth excluding third molars. Exclusion criteria were: (i) diagnosis of chronic/aggressive periodontitis (Armitage 1999); (ii) presence of acute dental or periodontal disease; (iii) smoking habit; (iv) presence of systemic disease and/or medication affecting the periodontium; and (v) receipt of systemic antibiotic treatment or dental prophylaxis in previous 6 months.

In addition, to the above inclusion/exclusion criteria, pregnant women were included if they were in the 12th-14th week of pregnancy in the first visit and non-pregnant women were excluded if they were taking contraceptive drugs or if they were pregnant or planning to be so.

Study design

Data were gathered on the pregnant women at four visits: at the end of the first trimester (12-14 weeks of pregnancy), second trimester (23-25 weeks of pregnancy) and third trimester (33-36 weeks of pregnancy) and at three months post-delivery. Data on non-pregnant women were collected at two visits six months apart, matching the first and third visits of the pregnant group. The hormone status of the menstrual cycle was

controlled by scheduling visits for the non-pregnant women during the luteal phase (days 17-21) of the cycle (Zaki et al. 1984).

Primary outcome (microbiological) variables and secondary outcome (clinical and hormone) variables were evaluated at each visit (Figure 1), collecting (in this order): saliva sample for hormone analysis, plaque index, microbiological sample and, finally, gingival index. After all evaluations and sampling, patients received oral hygiene instructions, a toothbrush (Vitis access®, Dentaid, Barcelona, Spain) and a dentifrice (Colgate Total®, Palmolive®, Piscataway, NJ, U.S.A.). At the end of the study, all subjects received a dental prophylaxis.

Microbiological analysis

Bacterial sampling

A pooled subgingival sample was obtained from four sampled sites. At each visit, the sample was obtained from the four interproximal sites showing the most marked inflammation per quadrant, excluding those sites in which a periopaper strip (Harco, Irvine, CA, USA) was inserted for immunological analysis (described in part I of the study, Figuero et al. submitted). After careful removal of supragingival plaque deposits, sampling sites were isolated with cotton rolls and gentle air drying, and two sterile #30 paper points (Zipperer®, United Dental MFRS Inc., West Palm Beach, FL, U.S.A.) were then consecutively inserted into the depth of the sulcus and left in place for 10 s. All paper points were transferred to the same vial containing 1.5 ml of reduced transport fluid (RTF) (Syed & Loesche 1972) and maintained at 4°C until their inoculation within 24 h. All microbiological samples were taken by the same examiner (AC).

Culture procedures

Cultures were performed at the Laboratory of Oral Microbiology, School of Dentistry, Madrid Complutense University (Spain). Samples were vortexed for 30 s and 10-fold serially diluted in RTF, and 0.1 ml of each dilution was then plated on non-selective 5% horse blood agar plates (Oxoid no. 2, Oxoid Ltd, Basingstoke, UK) supplemented with haemin (5 mg/l) and menadione (1 mg/l) for determination of total anaerobic bacterial counts and specific periodontal pathogens (*P. intermedia/nigrescens*,

1
2
3 *P. gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra*,
4 *Eikenella corrodens*, *Campylobacter rectus* and *Capnocytopaga* sp.). Total anaerobic
5 counts were done after 7–14 days of incubation by means of a stereo microscope (SDZ-
6 PL, Kyowa Optical Co. Ltd. Hashimoto, Japan). Blood agar plates were incubated at
7 37°C in 80% N₂, 10% CO₂ and 10% H₂. The presence and numbers of the putative
8 periodontal pathogens were recorded, confirming their identification by means of Gram
9 staining and cell morphology, aero tolerance, production of catalase and other
10 biochemical reactions (Rapid ID 32A, BioMerieux SA, Le-Balme-les-Grottes, France).
11
12

13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
Samples were also plated on Dentaid-1 medium (Alsina et al. 2001) for isolation
and counting of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Dentaid-1 plates were
incubated in air with 5% CO₂ at 37°C for 2 days. Total *A. actinomycetemcomitans*
counts were obtained, identifying the bacteria from their characteristic colony
morphology (star-like inner structure), a positive catalase reaction with 3% hydrogen
peroxide and a set of specific enzymes (APIZYM, BioMerieux SA, Le-Balme-les-
Grottes, France).

Clinical examination

Full-mouth supragingival plaque (PII) and gingival (GI) indices were recorded at
four sites per tooth (mesial, distal, buccal and lingual) with a CPC-12 periodontal probe
(Hu-Friedy®, Leimen, Germany) according to Silness and Löe (Silness & Löe 1964)
and Löe & Silness (Löe & Silness 1963), respectively. All clinical parameters were
recorded by the same examiner (EF).

Hormone level measurement in saliva (Progesterone and Estradiol)

Unstimulated saliva was collected in a sterile glass tube for 2 min (Tallon et al. 1984,
Gann et al. 2001) after patients had rinsed their mouths with water and rested for 5 min.
Samples were frozen and stored at -20°C until further analysis (Gann et al. 2001,
Meulenberg & Hofman 1989, Morishita et al. 1988, Tallon et al. 1984, Zaki et al. 1984).
Progesterone and estradiol levels were determined by means of a competitive
immunoenzymatic colorimetric method (DIA.METRA SRL, Foligno®, Italy).

The material and methods employed in this study were partially described in part I
(Figuro et al. submitted).

Data management and statistical analysis

Counts of the culture-identified pathogens were done by direct counting of the selected colonies with a stereo microscope (SDZ-PL, Kyowa Optical Co. Ltd. Hashimoto, Japan) on suitable plates (with 30-300 colonies) and estimated in relation to the original sample. Total anaerobic counts were also calculated on blood agar plates. Results were expressed in colony-forming units per ml (CFU/ml). After identification, proportions of the different pathogens were calculated and expressed as a percentage of the total colony forming units.

A subject-level analysis was performed for each study parameter. As goodness-of-fit was not assumed due to the skewed distribution of the data, non-parametric tests were used for the microbiological analysis.

Intra-group differences in counts and proportions of the periodontal pathogens over time were tested by means of non-parametric analysis of variance (ANOVA) Friedman test. Post hoc comparisons were performed by Bonferroni's method.

Frequency of pathogens detection was obtained by transforming the results into categorical data and using the McNemar test to evaluate intra-group differences and the X^2 test to compare inter-group differences. The correlation between pairs of variables was evaluated by using the nonparametric Spearman's rank correlation coefficient (correlation of microbiological with hormonal and clinical data).

Differences in the GI during pregnancy depending on the presence (positive patients) / absence (negative patients) of the different pathogens were evaluated with the aim of Mann -Whitney U-test. Differences in the PII were also included in the subgroup analysis to control the effect of plaque on the GI.

To determine differences between pregnant and non-pregnant women Mann-Whitney U test was used.

Statistical significance was established at the 95% confidence level. SPSS for Windows (SPSS Inc. version 16.0) was used for the data analyses.

Results

Study population

Sixty pregnant women were invited to participate in the study. Out of this sample, 48 agreed to participate and 42 complied with the three visits during the whole pregnancy. Reasons for the loss of patients to the study were miscarriage (3), preterm

birth (1), isolation for suspicion of tuberculosis (1) and personal reasons/no time available (1); their data were excluded from the analyses. The fourth postpartum visit was complied by 26 women, and the remaining 16 were lost for personal reasons (no time, loss of interest). No differences in any of the microbiological variables evaluated were found between the women who completed the follow up and the 16 who withdrew after the delivery (non parametric ANOVA Friedman test; data not shown).

Thirty non-pregnant women were invited to participate in the study, and 28 of these were enrolled after voluntarily agreeing to participate. After six months of follow-up, 8 patients were lost (4 started taking oral contraceptives, 4 argued loss of interest/no time) and their data were excluded from the analysis. No differences in microbiological results were found between the non-pregnant women who completed the follow-up and the 8 who withdrew the second visit (non parametric ANOVA Friedman test; data not shown).

Microbiological results during pregnancy and postpartum

Total bacterial counts

No significant changes in total bacterial counts were observed in the pregnant group during pregnancy or after delivery (Table 1).

Frequency of detection of pathogens

Table 2 shows the prevalence of the studied periodontal pathogens in the subgingival plaque samples from the pregnant women followed up throughout their pregnancy. The most frequently detected pathogen during pregnancy was *F. nucleatum* (range 88.10–97.62%), followed in descending order by *P. intermedia* (47.62–66.67%), *P. micra* (42.86–50.00%), *P. gingivalis* (35.71–40.48%), *C. rectus* (11.90–14.29%), *A. actinomycetemcomitans* (9.52–21.43%) and *T. forsythia* (2.38–9.52%).

The frequency of pathogen detection was relatively constant throughout the pregnancy and tended to decrease after delivery, when there was a significant reduction in *A. actinomycetemcomitans* ($p=0.039$).

Proportions (%) of bacterial species

Table 3 summarizes the relative proportions of bacterial species isolated throughout pregnancy and postpartum. The studied pathogens exhibited a common pattern during pregnancy characterized by a progressive increase during the pregnancy,

with a peak at either the second or the third trimester, depending on the pathogen. Non parametric ANOVA Friedman test failed to achieve statistically significant differences during pregnancy for any of the pathogens evaluated. However, changes from the third trimester to postpartum were significant for all the pathogens. *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *P. micra* and *F. nucleatum* demonstrated abrupt clear decrease after delivery whereas *P.intermedia* and *C. rectus* significantly increase postpartum in comparison to the third trimester.

Proportions in positive samples of different bacterial species

Frequency of detection varied among patients for the different pathogens. In order to evaluate the microbiological pattern in positive samples, “positive” and “negative” patient subgroups were formed according to the presence /absence of the pathogen in the second trimester (Herrera et al. 2008) (Table 4).

The proportions of *A. actinomycetemcomitans* in patients harbouring this pathogen was 2.24 % in the first trimester, reached a peak in the second trimester (10.80%) and decrease to 5.69 % in the third term ($p=0.01$). Following the same pattern, the proportions of *P. micra* went from 4.88% to 6.18% and 4.55% in the first, second and third trimester, respectively. Changes in *P.micra* proportions were significant at the third trimester-visit ($p<0.05$).

No significant changes were observed in any of the remaining periodontal pathogens studied. Proportions of *P.gingivalis* positive patients went from 14.94% at the first trimester, slightly decrease to 11.25% during the second trimester and reached a peak of 20.07% at the third term ($p=0.052$).

Gingival inflammation in patients harbouring periodontal pathogens

A comparison between positive and negative patients for the different pathogens was made in order to detect differences in their GI. Changes in the PII were also evaluated to control the effect of plaque over the GI.

The bacterial species whose presence was associated with an increase in the GI were *P. gingivalis* and *P. intermedia*. Subjects who were positive for *P. gingivalis* had higher levels of gingival inflammation versus *P. gingivalis*–negative patients, regardless of their PII, in all trimesters of pregnancy. This increase was significant in the second ($p<0.001$) and third trimesters ($p=0.009$) and no differences were found after delivery. The GI was 1.34 (standard deviation [SD] 0.34) in positive patients versus 0.98 (SD

0.45) in negative patients in the second trimester, and 1.35 (0.34) in positive patients versus 0.98 (0.46) in negative patients in the third trimester (Table 5).

The GI and PII were both higher in pregnant women harbouring *P.intermedia* than in those with negative culture for this pathogen (Table 6), with a significant difference in the second trimester ($p=0.026$). This tendency was also observed for *A. actinomycetemcomitans*- positive patients in the first trimester, although the difference in GI did not reach significance ($p=0.053$).

Correlations between clinical, hormonal and microbiological outcomes

The increase in salivary progesterone concentrations from the first to second trimester was positively correlated with *P. gingivalis* ($r=0.357$, $p=0.016$). A positive correlation was also found at this stage between GI exacerbation and increase in *P. intermedia* ($r=0.345$, $p=0.020$). From the second to third trimester of pregnancy, estradiol concentration was correlated with *P. gingivalis* ($r=0.324$, $p=0.041$).

Comparison between pregnant and non-pregnant women

The non-pregnant group showed no significant differences in microbiological outcomes between the two visits (separated by 6-month interval).

Total bacterial counts

Total bacterial counts tended to be higher in the pregnant versus non-pregnant women. The difference was only significant at the first-trimester visit, and no differences were found between the third-trimester visit of the pregnant women and the 6-month follow-up visit of the non-pregnant women (Table 1).

Frequency of detection of bacterial species

Table 2 describes the prevalence of the periodontal pathogens in subgingival plaque samples from the pregnant and non-pregnant groups, again comparing first-trimester and third-trimester results for the pregnant women with baseline and six-month follow-up results for the non-pregnant women. In the first-trimester/baseline visit comparison, only the frequency of *P. intermedia* detection was significantly higher in the pregnant group (61.90 %) than in the non-pregnant group (47.62 %). In the third-trimester/six-month visit comparison, *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* were more frequently present, detecting *A. actinomycetemcomitans* in 21.43% of the pregnant

women but none of the non-pregnant group and *P. gingivalis* in 38.10% of the pregnant women and 5% of the non-pregnant women.

Proportions (%) of bacterial species

Qualitative differences in subgingival bacterial composition were detected between the pregnant and non-pregnant woman, finding higher proportions of periodontal pathogens in the pregnant versus non-pregnant women. Proportions of *P. intermedia* were significantly higher at the first-trimester visit in the pregnant group than at the first visit in non-pregnant group. Proportions of *A. actinomyces* and *P. gingivalis* were significantly higher at the third-trimester visit in the pregnant group than at the 6-month visit in the non-pregnant group.

Comparison of postpartum with non-pregnant women

At three months after delivery, the pregnant women did not significantly differ from the non-pregnant group in any of the pathogens evaluated.

Discussion

This open cohort longitudinal study was designed to assess whether pregnancy induces a change in the subgingival biofilm that could be responsible for the exacerbated gingival inflammation observed in pregnant women. In the present study, no changes were found in the subgingival microbiological profile throughout pregnancy, although significant differences were found for all the periodontal pathogens after delivery. This implies a qualitative modification of the subgingival biofilm from pregnant to post-partum status. A worsening of the clinical parameters was also associated to the presence of *P. gingivalis* and *P. intermedia*, which were positively correlated with the salivary hormone levels.

To evaluate the exposure of gingival tissues to pregnancy changes, a cohort study was undertaken as it offers the better control of confounding factors within observational studies (Stroup et al. 2000). The study population consisted of a group of pregnant women with no presence or history of periodontitis that was compared, in a secondary analysis, with a control group of non-pregnant women. To evaluate the subgingival microbiological pattern during pregnancy, the pregnant women were followed longitudinally throughout the three trimesters of pregnancy and were re-evaluated at three months after delivery, following the practice of previous studies that addressed the effect of pregnancy on the periodontium (Cohen et al. 1969, Cohen et al.

1971, Chaikin et al, 1977, Tilakaratne et al. 2000, Yalcin et al, 2002, Gursoy et al. 2008).

Culture was the method used to determine periodontal pathogens because of its accuracy and ability to simultaneously detect and quantify multiple bacterial species and reveal unexpected bacteria (Sanz et al. 2004). The limitations of culture include the higher detection threshold versus PCR and the difficulty of growing some periodontal pathogens, such as *T. forsythia* (Lau et al. 2004). Samples were taken at whole mouth sites with greatest inflammation, carefully evaluating anterior localizations, where pregnancy gingivitis typically develops (Löe 1963, Raber-Durlacher et al. 1993, Raber-Durlacher et al. 1994).

Within the limitations of the study, it is important to highlight the elevated dropout rate (especially after delivery), although the sample size was powerful enough to detect significant differences for all the pathogens in the comparison of the third trimester- with the postpartum-visit. Another remarkable study weakness was the lack of homogeneity between the pregnant and non-pregnant groups in demographic characteristics and initial clinical status, what hampers the comparison between groups. Educational level of pregnant women in our study was lower than non pregnant group. As previously described, the oral health status in pregnant women is related to the level of education, professional status and previous dental attendance (Machuca et al. 1999, Sarlati et al. 2004, Yalcin et al. 2002, Taani et al. 2003). To what extent these differences could have influenced the microbiological results in the comparison between pregnant and not pregnant patients has not been reported earlier.

Total bacterial counts

We first ruled out the possibility that an increase in the subgingival total bacterial count during pregnancy might be responsible for the clinical changes observed. No significant differences in total bacterial counts were observed among the different trimesters of pregnancy, implying that no quantitative microbiological changes were responsible of the exacerbation in the gingival inflammation, what is in agreement with previous reports (Kornman & Loesche 1980, Jonsson et al. 1988, Yokoyama et al. 2008, Adriaens et al. 2009).

Frequency of detection of pathogens

Patients who harboured pathogens from the beginning of pregnancy maintained levels above the culture detection threshold until delivery, after which the frequency of detection decreased. The prevalence of *A. actinomycetemcomitans* during pregnancy ranged from 16.4% to 20.5%, higher than the 6.3% detected by culture in a sample of patients with gingivitis in Spain (Lau et al. 2004). Comparisons cannot be made with previous culture findings in pregnant women without periodontitis, since this pathogen was not included in the subgingival microbiological analyses (Kornman & Loesche 1980, Jensen et al. 1981, Jonsson et al. 1988, Raber-Durlacher et al. 1994, Muramatsu et al. 1994). With checkerboard DNA-DNA hybridization technology, 25 % of the tested sites were positive for *A. actinomycetemcomitans* (Adriaens et al. 2009). *A. actinomycetemcomitans* was not detected in our non-pregnant control group, taking into account that plaque and gingival indices were already low in this group at baseline.

P. gingivalis was detected in 40% of the pregnant women, similar to culture findings in the Spanish population with gingivitis (Lau et al. 2004) and higher than the 20% obtained by the Swiss group with checkerboard DNA-DNA hybridization (Adriaens et al. 2008).

Proportions of pathogens

Minor differences were observed in the composition of the subgingival microbiota during pregnancy, although significant differences appeared at the postpartum visit, where a generalized reduction of the pathogenic bacterial load was established. In this sense, the microbiological results corroborate our clinical findings (part I, Figuero et al. submitted). A more pathogenic subgingival flora was associated to an increased gingival inflammation status during pregnancy. After delivery, the microflora suffered a qualitative change, and the frequency of detection, counts and percentages of pathogens fell sharply, as previously described (Kornman & Loesche 1982, Raber-Durlacher et al. 1994). This was clinically associated with a decrease of the GI despite the concomitant increase of the PII observed. Changes in the postpartum microflora have also been reported by means of checkerboard DNA-DNA hybridization for eight of 37 species analyzed (*Eubacterium saburreum*, *F. nucleatum naviforme*, *F. nucleatum polymorphum*, *Leptotrichia buccalis*, *P. micra*, *Selenomonas noxia*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans*)(Adriaens et al. 2009).

Within the generalized reductions in periodontal pathogens, species such *P.intermedia* and *P.micra* suffered an overgrowth after delivery. Gürsoy et al. (2009)

corroborates our results after reporting a significant increase of *P.intermedia sensu lato* 4-6 weeks after delivery. Muramatsu & Takaesu (1994) also observed an increase of *P. intermedia* proportions 1 month after delivery. Other recent studies have reported higher bacterial levels of *Actinomyces neuui*, *Bifidobacterium bifidum*, *Corynebacterium pseudogenitalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas bivia* and *Pseudomonas aeruginosa* in parous women with gingivitis, suggesting that gingivitis is common at a considerable time after delivery (Persson et al. 2008, Persson et al. 2009).

To avoid underestimation of the true impact of the pathogens in positive patients, especially in those with lower frequency of detection, proportions in positive samples were analyzed (Herrera et al. 2008). All the pathogens showed the highest proportions at the second term and slightly decrease at the third term, except for *P. gingivalis* and *T. forsythia*. This pattern, significant for *A. actinomycetemcomitans* and *P. micra*, is in agreement with previous reports (Korman & Loesche 1982, Adriaens et al. 2009, Gürsoy et al. 2009). Proportions of *P. gingivalis* in positive patients tend to progressively increase during pregnancy, with a peak at the third term and an abrupt decrease after delivery. The increase in *P. gingivalis* can be plausibly explained by the presence in the medium of progesterone, an overgrowth factor for this pathogen (Korman & Loesche 1982). It should be borne in mind that classical studies grouped *P. gingivalis* together with *P. intermedia* such as black-pigmented *Bacteroides* (Jensen et al, 1981) before taxonomic reclassification (Shah et al, 1988; Shah et al, 1990). In fact, there has been no previous report of an increase in *P. gingivalis* without grouping.

Although no significant change in *P. intermedia* was found, it also tended to increase during the pregnancy. In their review on subgingival microflora in pregnancy, Korman & Loesche (1980) reported a significant increase in the percentage and total colony forming units of *P. intermedia* only during the second trimester, with a reduction during the third trimester and after delivery. If bacterial growth were mainly dependent on sex hormones, *P. intermedia* levels would show a greater increase and not a decrease during the third trimester (Mariotti et al. 1994). Jensen et al. (1981) found a 55-fold increase in pregnant women and a 16-fold increase in women taking oral contraceptives, although their analysis was limited to black-pigmented and *Fusobacterium* species in a cross-sectional study. Raber-Durlacher et al. (1994) performed a 14-day experimental gingivitis study after an intensive oral hygiene program in the 25th week of pregnancy and repeated the model after delivery. In the pregnancy, the mean percentage of *P. intermedia* increased during experimental gingivitis (from 1.1% to 10%), but no such

1
2
3 increase was observed postpartum. The same study detected no *P. gingivalis*, although
4 plaque accumulation was only for 14 days and started after an intensive plaque control
5 regimen, impeding colonization by *P. gingivalis*. Muramatsu et al. (1994) also found a
6 significant increase in *P. intermedia* during the second and third trimester in a Japanese
7 population.
8
9

10
11 A cross-sectional study (Jonsson 1988) found no significant differences in the
12 total counts and percentage of *P. intermedia* between pregnant and non-pregnant
13 women or any correlation with the progression of the pregnancy, but microbiological
14 samples were only taken from seven patients in the second and third trimesters.
15 Adriaens et al. (2008) reported a significant decrease of *P. intermedia* levels between
16 weeks 12 and 36 using a pairwise comparison, but an overgrowth of this pathogen was
17 not stated. Gürsoy et al. (2009) observed a transiently twice increase of *P. intermedia*
18 *sensu lato* proportions during the second term, but differences were again not
19 significant. On the other hand, this group corroborated our results of the significant
20 overgrowth after delivery.
21
22

23 With regard to other sex-steroid gingivitis conditions, an increase in *P.*
24 *intermedia* has also been described with the use of high-dose oral contraceptives
25 (Klinger et al. 1998) and with the onset of puberty (Nakagawa et al. 2004). Van Öosten
26 et al. (1988) found an increase in black-pigmented *Bacteroides* and spirochaetes in
27 prepubertal children. However, other authors found no differences (Gusberti, 1990).
28
29

30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41 **Gingival inflammation in patients harbouring periodontal pathogens**

42 A remarkable finding of the present study was the significantly greater gingival
43 inflammation in the women who were positive for certain pathogens, suggesting that
44 severe signs of gingival inflammation may develop in pregnant women who harbour
45 specific pathogens (above culture threshold). *P. gingivalis* was associated with a
46 significant increase in GI that was independent of the amount of plaque, whereas the
47 increased inflammation observed in *P. Intermedia*-positive women was concomitant
48 with an increase in plaque levels. These results may explain, at least in part, why only
49 some pregnant women develop more severe forms of gingivitis unrelated to the amount
50 of plaque, due to the presence of certain periodontal pathogens, especially *P. gingivalis*.
51 *P. gingivalis* and *P. nigrescens*, as well as *F. nucleatum* and *T. forsythia* have already
52 been associated to bleeding on probing (Adriaens et al. 2009, Gürsoy et al. 2009)
53
54
55
56
57
58
59
60

The increase in *P. gingivalis* levels was correlated with a concomitant rise in the gingival index from the first to the second trimester, which strengthens the hypothesis that this pathogen plays a role in exacerbating inflammation. *P. intermedia* was also positively correlated with sex steroid hormones, in agreement with other reports (Kornman & Loesche 1980, Muramatsu et al. 1994, Nakagawa et al. 1994). Yokoyama et al. (2008) reported a correlation between estradiol concentration and *C. rectus* levels that was not corroborated in our study, considering that the periodontopathogenic bacteria were determined in saliva samples.

Conclusion

Within the limitations of the present study, it can be concluded that pregnant women tended to present a more pathogenic bacterial profile compared to post-partum, what was concomitant with the worsening of clinical parameters. A more severe gingival inflammation was observed in pregnant women who harbour certain periodontal pathogens above the culture threshold from pregnancy onset, suggesting that the exacerbation of pregnancy gingivitis observed in some women may be, at least in part, related to a more pathogenic microbiological profile; however, more studies are needed to further investigate in this field.

References

Adriaens, L.M., Alessandri, R., Spörri, S., Lang, N.P., Persson, G.R. (2009) Does pregnancy have an impact on the subgingival microbiota?. *Journal of Periodontology* **80**, 72-81.

Amar, S., Chung, K.M. (1994) Influence of hormonal variation on the periodontium in women. *Periodontology 2000* **6**, 79-87.

Arafat, A.H. (1974) Periodontal status during pregnancy. *Journal of Periodontology* **45**, 641-643.

Armitage, G.C. (1999) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of Periodontology* **4**, 1-6.

Chaikin, B.S. (1977) Incidence of gingivitis in pregnancy. *Quintessence International Dental Digest* **8**, 81-89.

Cohen, D.W., Friedman, L., Shapiro, J. & Kyle, G.C. (1969) A longitudinal investigation of the periodontal changes during pregnancy. *Journal of Periodontology* **40**, 563-570.

Cohen, D.W., Shapiro, J., Friedman, L., Kyle, G.C. & Franklin, S. (1971) A longitudinal investigation of the periodontal changes during pregnancy and fifteen months post-partum. II. *Journal of Periodontology* **42**, 653-657.

Delaney, J.E., Ratzan, S.K., Kornman, K.S. (1986) Subgingival microbiota associated with puberty: studies of pre-, circum-, and postpubertal human females. *Pediatric Dentistry* **8**, 268-75.

Dyer, R.F., Sodek, J., Heersche, J.N. (1980) The effect of 17 beta-estradiol on collagen and noncollagenous protein synthesis in the uterus and some periodontal tissues. *Endocrinology* **107**, 1014-21.

Figuro, E., Carrillo-de-Albornoz, A., Herrera, D. & Bascones-Martínez, A. (2009) Gingival changes during pregnancy (I). Influence of hormonal variations on clinical and immunological parametes. Submitted.

Gann, P.H., Giovanazzi, S., Van Horn, L., Branning, A. & Chatterton, R.T., Jr. (2001) Saliva as a medium for investigating intra- and interindividual differences in sex hormone levels in premenopausal women. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **10**, 59-64.

- Gibbons, R.J., & MacDonald, J.B. (1960) Hemin and vitamin K compounds as required factors for the cultivation of certain strains of *Bacteroides melaninogenicus*. *Journal of Bacteriology* **80**, 164-170.
- Güncü, G.N., Tözüm, T.F. & Çağlayan, F. (2005) Effects of endogenous sex hormones on the periodontium. Review of the literature. *Australian Dental Journal* **50**, 138-145.
- Gürsoy, M., Pajukanta, R., Sorsa, T. & Kononen, E. (2008) Clinical changes in periodontium during pregnancy and post-partum. *Journal of Clinical Periodontology* **35**, 576-583.
- Gürsoy, M., Haraldsson, G., Hyvönen, M., Sorsa, T., Pajukanta, R., Könönen, E. (2009) Does the frequency of *Prevotella intermedia* increase during pregnancy? *Oral Microbiology and Immunology* **24**, 299-303.
- Gusberti, F.A., Mombelli, A., Lang, N.P. & Minder, C.E. (1990) Changes in subgingival microbiota during puberty. A 4-year longitudinal study. *Journal of Clinical Periodontology* **17**, 685-92.
- Herrera, D., Contreras, A., Gamonal, J., Oteo, A., Jaramillo, A., Silva, N., Sanz, M., Botero, J.E., León, R. (2008) Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. *Journal of Clinical Periodontology* **35**, 106-113.
- Hofman, L.F. (2001) Human saliva as a diagnostic specimen. *Journal of Nutrition* **131**, 1621S-1625S.
- Hugoson, A. (1970) Gingival inflammation and female sex hormones. A clinical investigation of pregnant women and experimental studies in dogs. *Journal of Periodontal Research Suppl* **5**, 1-18.
- Hugoson, A. (1971) Gingivitis in pregnant women. A longitudinal clinical study. *Odontologisk revy* **22**, 65-84.
- Jensen, J., Liljemark, W. & Bloomquist, C. (1981) The effect of female sex hormones on subgingival plaque. *Journal of Periodontology* **52**, 599-602.
- Jonsson, R., Howland, B.E. & Bowden, G.H. (1988) Relationships between periodontal health, salivary steroids, and *Bacteroides intermedius* in males, pregnant and non-pregnant women. *Journal of Dental Research* **67**, 1062-1069.
- Kaufman, E. & Lamster, I.B. (2002) The diagnostic applications of saliva--a review. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* **13**, 197-212.

- 1
- 2
- 3 Klinger, G., Eick, S., Klinger, P., Grase, T., Moore, C., Oettel, M. (1998) Influence of
- 4 Hormonal Contraceptives on Microbial Flora of the Gingival Sulcus.
- 5 *Contraception* **57**, 381- 384.
- 6
- 7
- 8 Kornman, K.S. & Loesche, W.J. (1980) The subgingival microbial flora during
- 9 pregnancy. *Journal of Periodontal Research* **15**, 111-122.
- 10
- 11 Kornman, K.S. & Loesche, W.J. (1982) Effects of estradiol and progesterone on
- 12 *Bacteroides melaninogenicus* and *Bacteroides gingivalis*. *Infection and Immunity*
- 13 **35**, 256-263.
- 14
- 15
- 16
- 17 Laine, M.A. (2002) Effect of pregnancy on periodontal and dental health. *Acta*
- 18 *Odontologica Scandinavica* **60**, 257-264.
- 19
- 20
- 21 Lapp, C.A., Thomas, M.E. & Lewis, J.B. (1995) Modulation by progesterone of
- 22 interleukin-6 production by gingival fibroblasts. *Journal of Periodontology* **66**,
- 23 279-84.
- 24
- 25
- 26 Lapp, C., Lohse, J., Lewis, J., Dickinson, D., Billman, M., Hanes, P. & Lapp, D. (2003)
- 27 The effect of Progesterone on Matrix Metalloproteinases in Cultured Human
- 28 Gingival Fibroblasts. *Journal of Periodontology* **74**, 277-288.
- 29
- 30
- 31 Lau, L., Sanz, M., Herrera, D., Morillo, J.M., Martín, C., Silva, A. (2004) Quantitative
- 32 real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two
- 33 methods for the detection and quantification of *Actinobacillus*
- 34 *actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in
- 35 subgingival plaque samples. *Journal of Clinical Periodontology* **31**, 1061-9.
- 36
- 37
- 38
- 39
- 40 Lie, M.A, van der Weijden, G.A., Timmerman, M.F., Loos, B.G., van Seteenbergen,
- 41 T.JM. & van der Velden, U. (2001) Occurrence of *Prevotella intermedia* and
- 42 *Prevotella nigrescens* in relation to gingivitis and gingival health. *Journal of*
- 43 *Clinical Periodontology* **28**,189-193.
- 44
- 45
- 46
- 47 Lieff, K., Murtha, A., Lieff, S., Boggess, KA., Murtha, A.P., Jared, H., Madianos, P.N.,
- 48 Moss, K., Beck, J. & Offenbacher, S. (2004) The oral conditions and pregnancy
- 49 study: periodontal status of a cohort of pregnant women. *Journal of*
- 50 *Periodontology* **75**, 116-26.
- 51
- 52
- 53
- 54 Lindhe, J. & Branemark, P.I. (1967a) Changes in microcirculation after local
- 55 application of sex hormones. *Journal of Periodontal Research* **2**, 185-193.
- 56
- 57
- 58 Lindhe, J. & Branemark, P.I. (1967b) Changes in vascular permeability after local
- 59 application of sex hormones. *Journal of Periodontal Research* **2**, 259-265.
- 60

- Lindhe, J. & Branemark, P.I. (1968a) Experimental studies on the etiology of pregnancy gingivitis. *Periodontal abstracts* **16**, 50-51.
- Lindhe, J. & Branemark, P.I. (1968b) The effects of sex hormones on vascularization of granulation tissue. *Journal of Periodontal Research* **3**, 6-11.
- Lindhe, J., Branemark, P.I. & Lundskog, J. (1967) Changes in vascular proliferation after local application of sex hormones. *Journal of Periodontal Research* **2**, 266-272.
- Lindhe, J. & Sonesson, B. (1967) Effect of sex hormones on inflammation. *Journal of Periodontal Research* **2**, 7-12.
- Löe, H. (1965) Periodontal changes in pregnancy. *Journal of Periodontology* **36**, 209-217.
- Loe, H. & Silness, J. (1963) Periodontal Disease in Pregnancy. I. Prevalence and Severity. *Acta Odontologica Scandinavica* **21**, 533-551.
- Lopatin, D.E., Kornman, K.S. & Loesche, W.J. (1980) Modulation of immunoreactivity to periodontal disease-associated microorganisms during pregnancy. *Infection and Immunity* **28**, 713-718.
- Lundgren, D. & Lindhe, J. (1971) Lack of influence of female sex hormones on alveolar bone loss in hamsters. *Scandinavian Journal of Dental Research* **79**, 113-118.
- Machuca, G., Khoshfeiz, O., Lacalle, J.R., Machuca, C. & Bullon, P. (1999) The influence of general health and socio-cultural variables on the periodontal condition of pregnant women. *Journal of Periodontology* **70**, 779-785.
- Maier, A.W. & Orban, B. (1949) Gingivitis in pregnancy. *Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology* **2**, 334-373.
- Mariotti, A. (1994) Sex steroid hormones and cell dynamics in the periodontium. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* **5**, 27-53.
- Mariotti, A. (1999) Dental plaque induced gingival diseases. *Annals of Periodontology* **4**, 7-17.
- Mariotti, A. (2005) Estrogen and Extracellular Matrix influence Human Gingival Fibroblast Proliferation and Protein Production. *Journal of Periodontology* **76**, 1391-1397.
- Mascarenhas, P., Gapski, R., Al-Shammari, K. & Wang, H.L. (2003) Influence of sex hormones on the periodontium. *Journal of Clinical Periodontology* **30**, 671-681.

Mealey, B.L. & Moritz, A.J. (2003) Hormonal influences: effects of diabetes mellitus and endogenous female sex steroid hormones on the periodontium. *Periodontology 2000* **32**, 59-81.

Meulenberg, P.M. & Hofman, J.A. (1989) Salivary progesterone excellently reflects free and total progesterone in plasma during pregnancy. *Clinical chemistry* **35**, 168-172.

Miyagi, M., Morishita, M. & Iwamoto, Y. (1993) Effects of sex hormones on production of prostaglandin E2 by human peripheral monocytes. *Journal of Periodontology* **64**, 1075-1078.

Miyazaki, H., Yamashita, Y., Shirahama, R., Goto-Kimura, K., Shimada, N., Sogame, A. & Takehara, T. (1991) Periodontal condition of pregnant women assessed by CPITN. *Journal of Clinical Periodontology* **18**, 751-754.

Mombelli, A., Lang, N.P., Bürgin, W.B., Gusberti, F.A. (1990). Microbial changes associated with the development of puberty gingivitis. *Journal of Periodontal Research* **25**, 331-8.

Morishita, M., Aoyama, H., Tokumoto, K. & Iwamoto, Y. (1988) The concentration of salivary steroid hormones and the prevalence of gingivitis at puberty. *Advances in Dental Research* **2**, 397-400.

Muramatsu, Y. & Takaesu, Y. (1994) Oral health status related to subgingival bacterial flora and sex hormones in saliva during pregnancy. *The bulletin of Tokyo Dental College* **35**, 139-151.

Nakagawa, S., Fujii, H., Machida, Y. & Okuda, K. (1994) A longitudinal study from prepuberty to puberty of gingivitis. Correlation between the occurrence of *Prevotella intermedia* and sex hormones. *Journal of Clinical Periodontology* **21**, 658-65.

O'Neil, T.C. (1979a) Maternal T-lymphocyte response and gingivitis in pregnancy. *Journal of Periodontology* **50**, 178-184.

O'Neil, T.C. (1979b) Plasma female sex-hormone levels and gingivitis in pregnancy. *Journal of Periodontology* **50**, 279-282.

Persson, G.R., Hitti, J., Paul, K., Hirschi, R., Weibel, M., Rothen, M. & Persson, R. E. (2008) *Tannerella forsythia* and *Pseudomonas aeruginosa* in subgingival bacterial samples from parous women. *Journal of Clinical Periodontology* **79**, 508-16.

- Persson, R., Hitti, J., Verhelst, R., Vaneechoutte, M., Persson, R., Hirschi, R., Weibel, M., Rothen, M., Paul, K., Temmerman, M. & Eschenbach, D. (2009) The vaginal microflora in relation to gingivitis. *BMC Infectious Diseases* **9**. [Epub ahead of print].
- Raber-Durlacher, J.E., Leene, W., Palmer-Bouva, C.C., Raber, J. & Abraham-Inpijn, L. (1993) Experimental gingivitis during pregnancy and post-partum: immunohistochemical aspects. *Journal of Periodontology* **64**, 211-218.
- Raber-Durlacher, J.E., van Steenberg, T.J., Van der Velden, U., de Graaff, J. & Abraham-Inpijn, L. (1994) Experimental gingivitis during pregnancy and post-partum: clinical, endocrinological, and microbiological aspects. *Journal of Clinical Periodontology* **21**, 549-558.
- Raber-Durlacher, J.E., Zeijlemaker, W.P., Meinesz, A.A. & Abraham-Inpijn, L. (1991) CD4 to CD8 ratio and in vitro lymphoproliferative responses during experimental gingivitis in pregnancy and post-partum. *Journal of Periodontology* **62**, 663-667.
- Samant, A., Malik, C.P., Chabra, S.K. & Devi, P.K. (1976) Gingivitis and periodontal disease in pregnancy. *Journal of Periodontology* **47**, 415-418.
- Sanz, M., Lau, L., Herrera, D., Morillo, J.M. & Silva, A. (2004) Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *Journal of Clinical Periodontology* **31**(12), 1034-47.
- Sarlati, F., Akhondi, N., Jahanbakhsh, N. (2004) Effect of general health and sociocultural variables on periodontal status of pregnant women. *Journal of the International Academy of Periodontology* **6** (3), 95-100.
- Shah, H.N., Collins, M.D. (1988) Proposal for reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides endodontalis* in a new genus, *Porphyromonas*. *International Journal of Systemic Bacteriology* **38**, 128-131.
- Shah, H.N., Collins, M.D. (1990) *Prevotella*, a new genus to include *Bacteroides melaninogenicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides*. *International Journal of Systemic Bacteriology* **40**, 205-208.
- Silness, J. & Loe, H. (1964) Periodontal Disease in Pregnancy. II. Correlation between Oral Hygiene and Periodontal Condition. *Acta Odontologica Scandinavica* **22**, 121-135.

- Sooriyamoorthy, M. & Gower, D.B. (1989) Hormonal influences on gingival tissue: relationship to periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* **16**, 201-208.
- Soory, M. (2000) Hormonal factors in periodontal disease. *Dental Update* **27**, 380-383.
- Streckfus, C.F. & Bigler, L.R. (2002) Saliva as a diagnostic fluid. *Oral Diseases* **8**, 69-76.
- Stroup, D.F., Berlin J.A., Morton S.C., Olkin, I., Williamson, G.D., Rennie, D., Moher, D., Becker, B.J., Sipe, T.A., Thacker, S.B. (2000) Meta-analysis of observational studies in epidemiology: a proposal for reporting. Meta-analysis of observational studies in epidemiology (MOOSE) group. *The Journal of the American Medical Association* **283**, 2008-2012.
- Syed, S.A. & Loesche, W.J. (1972). Survival of human dental plaque flora in various transport media. *Applied Microbiology* **24**, 638-644.
- Taani, D.Q., Habashneh, R., Hammad, M.M., Batieha, A. (2003) The periodontal status of pregnant women and its relationship with socio-demographic and clinical variables. *Journal of Oral Rehabilitation* **30**, 440-445.
- Tallon, D.F., Gosling, J.P., Buckley, P.M., Dooley, M.M., Cleere, W.F., O'Dwyer, E.M. & Fottrell, P.F. (1984) Direct solid-phase enzyme immunoassay of progesterone in saliva. *Clinical chemistry* **30**, 1507-1511.
- Tan, K. S., Song, K. P. & Ong, G. (2001a) *Bacteroides forsythus* prfH genotype in periodontitis patients: occurrence and association with periodontal disease. *Journal of Periodontal Research* **36**, 398-403.
- Tilakaratne, A., Soory, M., Ranasinghe, A.W., Corea, S.M., Ekanayake, S.L. & de Silva, M. (2000) Periodontal disease status during pregnancy and 3 months post-partum, in a rural population of Sri-Lankan women. *Journal of Clinical Periodontology* **27**, 787-792.
- Thomson, M.E. & Pack, A.R.C. (1982) Effects of extended and topical folate supplementation on gingivitis in pregnancy. *Journal of Clinical Periodontology* **9**, 275-280.
- van Oosten, M.A., Mombelli, A., Gusberti, FA. & Lang, N.P. (1988) Black-pigmented *Bacteroides* and spirochetes in the subgingival microbiota of prepubertal schoolchildren. *Journal of Periodontal Research* **23**(3), 199-203.

- Yalcin, F., Eskinazi, E., Soydinc, M., Basegmez, C., Issever, H., Isik, G., Berber, L., Has, R., Sabuncu, H. & Onan, U. (2002) The effect of sociocultural status on periodontal conditions in pregnancy. *Journal of Periodontology* **73**, 178-182.
- Yanover, L. & Ellen, R.P. (1986) A clinical and microbiologic examination of gingival disease in parapubescent females. *Journal of Periodontology* **9**, 562-7.
- Yokoyama, M., Hinode, D., Matsuda, K., Yoshioka, M. & Grenier, D. (2005) Effect of female sex hormones on *Campylobacter rectus* and human gingival fibroblasts. *Oral Microbiology and Immunology* **20**, 239-243.
- Yokoyama, M., Hinode, D., Yoshioka, M., Fukui, M., Tanabe, S., Grenier, D. & Ito, H.O. (2008) Relationship between *Campylobacter rectus* and periodontal status during pregnancy. *Oral Microbiology and Immunology* **23**, 55-59.
- Zachariasen, R.D. (1993) The effect of elevated ovarian hormones on periodontal health: oral contraceptives and pregnancy. *Women Health* **20**, 21-30.
- Zaki, K., el Hak, R., Amer, W., Saleh, F., El Faras, A., Ragab, L. & Nour, H. (1984) Salivary female sex hormone levels and gingivitis in pregnancy. *Biomedica Biochimica Acta* **43**, 749-754.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Dr. Itziar González, Ana O'Connor and Dr. Rubén León for their assistance at the research laboratory, and Dr. Pedro Cuesta and Santiago Cano for their statistical assistance. We are also grateful to Prof. Ubele van der Velden and Prof. Mariano Sanz, for their constructive comments; to Dr. Antonio González and Dr. Miguel Gallardo of La Paz Hospital (Madrid, Spain) who provided the facilities for examination of the pregnant-women; and to Colgate and Dentaïd for supplying the toothbrushes and the dentifrices for the patients.

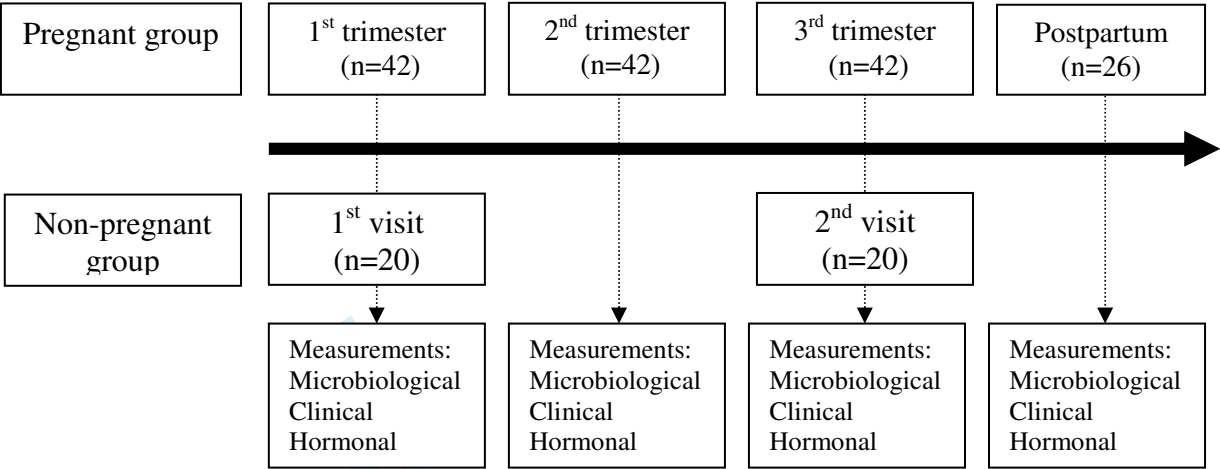


Figure 1. Research outline. Pregnant patients made four visits and the non-pregnant group two visits, corresponding in time to the first and third trimesters of pregnancy. Microbiological, clinical and hormonal data were recorded at all visits.

Total bacterial counts (in CFU).				
Pregnant group				
	1 st trimester	2 nd trimester	3 rd trimester	Postpartum
	(n=42)	(n=42)	(n=42)	(n=26)
Mean counts	5.32 x 10 ⁵	5.28 x 10 ⁵	5.03 x 10 ⁵	5.02 x 10 ⁵
Standard deviation	8.07 x 10 ⁵	8.30 x 10 ⁵	8.32 x 10 ⁵	9.50 x 10 ⁵
Non-pregnant group				
	Baseline	6 Months		
	(n=20)	(n=20)		
Mean counts	4.96 x 10 ⁵	4.63 x 10 ⁵		
Standard deviation	8.45 x 10 ⁵	8.69 x 10 ⁵		

Table 1. Total bacterial counts expressed in total colony forming units (CFU) in pregnant and non-pregnant women. Intragroup comparison (Friedman’s test with Bonferroni corrections). *p<0.05.

Frequency of detection of periodontal pathogens (percentage /absolute number)				
	Pregnant group			
	1 st trimester	2 nd trimester	3 rd trimester	Postpartum
	(n=42)	(n=42)	(n=42)	(n=26)
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	14.29 % (6)	9.52 % (4)	21.43 % (9)	7.69 % (2)*
<i>P. gingivalis</i>	35.71 % (15)	40.48 % (17)	38.10 % (16)	26.92 % (7)
<i>P. intermedia</i>	61.90 % (26)	66.67 % (28)	47.62 % (20)	57.69 % (15)
<i>T. forsythia</i>	9.52 % (4)	2.38 % (1)	7.14 % (3)	7.69 % (2)
<i>P. micra</i>	50.00 % (21)	42.86 % (18)	47.62 % (20)	38.46 % (10)
<i>C. rectus</i>	11.90 % (5)	14.29 % (6)	14.29 % (6)	7.69 % (2)
<i>F. nucleatum</i>	97.62 % (41)	92.86 % (39)	88.10 % (37)	80.77 % (21)
	Non-pregnant group			
	Baseline		6 Months	
	(n=20)		(n=20)	
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	0.00 % (0)		0.00 % (0)	
<i>P. gingivalis</i>	10.00 % (2)		5.00 % (1)	
<i>P. intermedia</i>	30.00* % (6)		40.00 % (8)	
<i>T. forsythia</i>	5.00 % (1)		0.00 % (0)	
<i>P. micra</i>	30.00 % (6)		30.00 % (6)	
<i>C. rectus</i>	10.00 % (2)		20.00 % (4)	
<i>F. nucleatum</i>	95.00 % (19)		85.00 % (17)	

Table 2. Frequency of detection of periodontal pathogens (percentage /absolute number related to group). * = p<0.05 in intragroup comparisons.

Relative proportions (%) of pathogens during pregnancy				
Bacterial species	1 st trimester	2 nd trimester	3 rd trimester	Postpartum
Relative proportion (SD)	(n=42)	(n=42)	(n=42)	(n=26)
<i>A.actinomycescomitans</i>	0.30 (1.47)	1.02 (6.10)	1.22 (4.26)	0.08** (0.41)
<i>P.gingivalis</i>	5.69 (12.17)	4.55 (8.76)	8.12 (17.19)	2.74** (8.13)
<i>P.intermedia</i>	2.37 (5.13)	3.13 (8.80)	2.55 (9.91)	3.83* (8.64)
<i>T.forsythia</i>	0.46 (2.16)	0.01 (0.04)	0.41 (1.66)	0.03* (0.14)
<i>P. micra</i>	2.66 (7.47)	3.27 (7.15)	2.06 (4.82)	1.95** (3.71)
<i>C. rectus</i>	0.07 (0.29)	0.15 (0.65)	0.13 (0.62)	0.26** (1.12)
<i>F. nucleatum</i>	5.38 (7.52)	5.59 (5.24)	5.38 (7.09)	4.01** (4.04)

Table 3. Longitudinal evaluation of the periodontal pathogens during pregnancy and at 3 months postpartum (intra-group comparison). Friedman’s test with Bonferroni corrections. * = p<0.05; ** = p<0.01.

	Mean percentage (SD) of flora in positive patients			Friedman	<i>p</i> value	
	1 st trimester	2 nd trimester	3 rd trimester	test <i>p</i> value	(Bonferroni correction)	
					1 st vs 2 nd trimester	2 nd vs 3 rd trimester
<i>Aa</i>	2.24 (3.54)	10.80(19.18)	5.69** (8.03)	< 0.01	NS	0.01
<i>P.gingivalis</i>	14.94 (16.05)	11.25 (10.80)	20.07 (22.43)	NS	NS	NS
<i>P.intermedia</i>	3.99 (6.18)	5.47 (10.98)	5.43 (14.01)	NS	NS	NS
<i>T.forsythia</i>	4.84 (5.96)	0.26 (0.00)	5.77 (3.17)	NS	NS	NS
<i>P. micra</i>	4.88 (9.81)	6.18 (9.30)	4.55 *(6.32)	<0.05	NS	<0.05
<i>C. rectus</i>	0.65 (0.66)	1.29 (1.58)	1.04 (1.51)	NS	NS	NS
<i>F. nucleatum</i>	5.63 (7.56)	6.36 (5.13)	6.28 (7.28)	NS	NS	NS

Table 4. Proportion in positive samples of periodontal pathogens during pregnancy. Intragroup comparison (Friedman's test with Bonferroni corrections). * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$.

Gingival inflammation in patients harbouring <i>P. gingivalis</i> - mean (SD)					
		1 st trimester	2 nd trimester	3 rd trimester	Postpartum
PII	<i>P. gingivalis</i> +	0.78 (0.34)	0.74 (0.27)	0.75 (0.25)	0.79 (0.24)
	<i>P.gingivalis</i> –	0.67 (0.38)	0.60 (0.36)	0.61 (0.32)	0.69 (0.30)
GI	<i>P.gingivalis</i> +	1.10 (0.41)	1.34** (0.34)	1.35** (0.34)	0.90 (0.29)
	<i>P.gingivalis</i> –	0.94 (0.44)	0.98 (0.45)	0.98 (0.46)	0.99 (0.40)

Table 5. Levels of plaque index (PII) and gingival index (GI) according to the presence (positive patients (+))/absence (negative patients (-)) of *Porphyromonas gingivalis* during pregnancy (intra-group comparison). * = p<0.05; ** = p<0.01.

Gingival inflammation in patients harbouring *P. intermedia* - mean (SD)

		1 st trimester	2 nd trimester	3 rd trimester	Postpartum
PII	<i>P.intermedia</i> +	0.76 (0.41)	0.77* (0.34)	0.72 (0.33)	0.76 (0.30)
	<i>P.intermedia</i> –	0.67 (0.38)	0.47 (0.21)	0.62 (0.26)	0.66 (0.26)
GI	<i>P.intermedia</i> +	1.05 (0.44)	1.26* (0.42)	1.26 (0.47)	0.91 (0.44)
	<i>P.intermedia</i> –	0.92 (0.42)	0.94 (0.42)	1.01 (0.40)	1.04 (0.27)

Table 6. Levels of plaque index (PII) and gingival index (GI) according to the presence (positive patients (+))/absence (negative patients (-)) of *P. intermedia* throughout pregnancy (intra-group comparison). * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$.